

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Detección y caracterización molecular del virus de influenza A en cerdos al sacrificio en Colombia

Juan Miguel Flórez Ramos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Programa de posgrados de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Bogotá, Colombia
2017

Detección y caracterización molecular del virus de influenza A en cerdos al sacrificio en Colombia

Juan Miguel Flórez Ramos

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Salud Animal

Director (a):

MV. MSc. PhD. Gloria Consuelo Ramírez Nieto

Línea de Investigación:

Diagnóstico y caracterización molecular de agentes de tipo viral

Grupo de Investigación:

Microbiología y Epidemiología Veterinaria

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Programa de posgrados de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Bogotá, Colombia

2017

A Dios por acompañarme todos los días y mostrarme su infinito poder de bendición en mi vida

A Daniela Y Sabrina, que han sido mi constante apoyo

A mis padres por estar siempre presentes en cada etapa de mi vida

Agradecimientos

Para mis padres quienes han estado presentes en cada etapa y nuevo emprendimiento en mi vida, brindándome su apoyo incondicional

A Daniela y Sabrina por cada momento de comprensión y cariño, que me ha dado la fuerza para continuar este camino.

A la Dra. Gloria Ramírez y al Dr. Víctor Vera por permitirme aprender cada día de ellos y ser una inspiración y ejemplo para continuar construyendo nuevas metas académicas y laborales

Para Doña Yanneth, Magda, Luz Dary y Ángela por ser compañeros de apoyo diario en la consecución de esta meta

A la Dra. Jenny Chaparro por su apoyo logístico para la recolección de muestras

A Colciencias, Porkolombia y la Universidad Nacional por aportar la financiación necesaria para el desarrollo de este proyecto

A todas las plantas de beneficio que permitieron desarrollar las actividades de recolección de muestras en sus instalaciones

Resumen

La influenza porcina es una enfermedad altamente contagiosa cuyo agente causal es un virus del género *Influenzavirus A*, que a su vez pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y que se caracteriza por presentar una alta variabilidad. Existen dos mecanismos principales de variación que permiten la adquisición de cambios moleculares en los virus de influenza, el *drift* o deriva antigénica y el *shift* antigénico (re-arreglos) que se manifiestan de forma cooperativa para la generación de cepas con nuevas características. Un ejemplo de lo anterior puede verse reflejado en la conformación y características del virus de influenza que llevaron a la presentación de la primera pandemia del siglo XXI, en el 2009. Tomando como punto de referencia la aparición y diseminación del virus de influenza A del tipo H1N1 pandémico de 2009 (H1N1pdm09) en la población de cerdos del mundo y los eventos ocurridos posteriormente, se han observado cambios moleculares importantes en los linajes del virus de influenza porcina, relacionados a un incremento en la tasa de re-arreglos con esta cepa. De acuerdo a esto y considerando los resultados de estudios previos en nuestro grupo de investigación que demuestran la introducción de este virus en el país, se plantea la necesidad de obtener nueva información acerca de los virus de influenza que circulan actualmente en cerdos en Colombia. Con este fin se llevó a cabo un estudio en el que se analizaron 788 muestras de tejido pulmonar recolectadas durante 2015-2017 a partir de cerdos en plantas de beneficio, los cuales procedían de 11 regiones geográficas de nuestro país. Una vez procesadas las muestras fueron analizadas empleando una técnica de qRT-PCR, la cual inicialmente tuvo como blanco el gen de la matriz de virus de influenza A. De acuerdo con el resultado obtenido, se realizaron análisis de sub-tipificación a las muestras positivas, empleando protocolos de amplificación para el gen de la Nucleoproteína (NP) de virus de influenza porcina, el gen de la HA del virus H1N1pdm09 y los genes HA y NA del subtipo H3N2 porcino. Adicionalmente se seleccionaron muestras para ser inoculadas en huevos de embrión de pollo libres de patógenos específicos (SPF) de 9-10 días y se confirmó el aislamiento de virus de influenza mediante las pruebas de hemaglutinación y RT-PCR. Posteriormente, se realizó

amplificación completa de los genes HA, NA, M y NS de los aislamientos obtenidos para llevar a cabo análisis de secuencias de nucleótidos y de filogenia. Como resultado de este estudio, fue posible la detección del virus de influenza A en 116 del total muestras, provenientes de cinco regiones geográficas distintas y el aislamiento y evaluación de 5 cepas de campo de virus de influenza A provenientes de las regiones de Antioquia y Cundinamarca, las cuales mostraron relación filogenética con virus de influenza del tipo H1N1pdm09. Los resultados obtenidos confirman la circulación permanente del virus de influenza A en las regiones de mayor producción en Colombia, así como la presencia del subtipo H1N1pdm09 en la población de cerdos del país. Tales hallazgos ponen en perspectiva la necesidad de extender los estudios de vigilancia en otras regiones y en diversas especies para establecer aspectos ecológicos asociados a los flujos de transmisión y factores de riesgo. La integración de estos hallazgos y el registro de nueva información ayudará a detectar cambios moleculares que contribuyan a establecer estrategias de prevención y control orientadas a la situación de la infección por virus de influenza A en cerdos, de manera que permitan anticipar el surgimiento de eventos de pandemia y/o epidemia.

Palabras clave: influenza A en cerdos, plantas de beneficio, tejido pulmonar, virus H1N1 pandémico de 2009, qRT-PCR, aislamiento viral, Colombia.

Abstract

Swine influenza is a highly contagious disease caused by an *influenzavirus A*, which is a member of the *Orthomyxoviridae* family. There are two main variation mechanisms considered to be the main source for new molecular changes in influenza virus: antigenic drift and shift (or reassortment) that operate in a cooperative mode for the emergence of strains that may acquire new characteristics. The appearance and spreading of 2009 pandemic H1N1 (H1N1pdm09) influenza virus in pig populations around the world played an important role causing major molecular changes in swine influenza lineages. On the other hand, co-circulation of pandemic and endemic strains has predisposed for increasing reassortment events. Considering these aspects and based on the results of previous studies in our research team, there is a need to provide new information about influenza virus in swine population in Colombia. In order to achieve this aim, we carried out a survey to analyze 788 lung tissue samples collected during 2015-2017 from pigs at slaughterhouses located in 11 different geographic regions of Colombia. The samples were processed and analyzed by initial qRT-PCR technique targeting the matrix gene of influenza A virus. Subsequently, subtyping analysis were performed on positive samples employing protocols for amplification of swine influenza virus Nucleoprotein (NP) gene, 2009 pandemic H1N1 influenza virus HA gene, and swine H3N2 HA and NA genes. Positive samples were inoculated in 9-10-day old specific pathogen free (SPF) embryo chicken eggs, and influenza isolates were confirmed by hemagglutination test and RT-PCR analysis. Full length amplification of HA, NA, M and NS genes of viral isolates were used for sequencing and phylogenetic analysis. Our results showed evidence of the influenza A virus from 116 samples collected in five geographic regions, 13 of which were identified as H1 subtype, and 3 as H1N1pdm09 virus after subtyping tests. Recovery and evaluation of the 5 influenza A field viral strains from Antioquia and Cundinamarca showed that these were grouped with H1N1pdm09 viruses. The results from this study confirmed that swine influenza virus continues circulating in the main pig producing regions in Colombia, also demonstrating the presence of the H1N1pdm09 subtype. Such findings highlight the importance of extending surveillance research to additional locations and to different species in order to examine ecologic aspects associated to the transmission pathway and risk factors for influenza infection. Integrating these findings

and gathering new information will support detection of new molecular changes and anticipate the emergence of new pandemic and/or endemic events.

Keywords: swine influenza, slaughterhouses, lung tissue, 2009 pandemic H1N1 influenza virus, qRT-PCR, virus isolation, Colombia.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVII
Introducción	1
1. Marco teórico.....	5
1.1 Generalidades del virus de influenza A en cerdos	5
1.1.1 Etiología	6
1.1.2 Ecología	8
1.2 Mecanismos de variabilidad molecular	10
1.2.1 <i>Drift</i> o deriva antigénica (mutaciones).....	10
1.2.2 <i>Shift</i> (rearreglos)	11
1.3 Evolución de los virus de influenza.....	13
1.3.1 Linajes genéticos	13
1.3.2 Trayectoria evolutiva del virus de influenza A en cerdos.....	14
1.4 Pandemia por virus de influenza en el 2009	19
1.5 Eventos postpandemia	22
1.5.1 Norte América.....	22
1.5.2 Latinoamérica	24
1.5.3 Europa.....	26
1.5.4 Asia	29
1.5.5 África y Australia.....	32
1.6 Situación en Colombia	33
Bibliografía	35
2. Monitoreo del virus de influenza A en cerdos en plantas de beneficio de Colombia.....	55
2.1 Resumen.....	55
2.2 Abstract.....	56
2.3 Introducción.....	57
2.4 Materiales y Métodos	61
2.4.1 Recolección y preparación de muestras	61
2.4.2 Análisis mediante RT-PCR tiempo real (qRT-PCR)	63

2.4.3	Aislamiento viral	65
2.5	Resultados.....	67
2.6	Aislamiento viral.....	68
2.7	Discusión	69
2.8	Conclusiones	72
Bibliografía		74
3. Molecular surveillance of influenza A virus in slaughterhouse pigs demonstrates presence of the virus from clinically normal animals in Colombia		
3.1	Abstract	81
3.2	Introduction.....	82
3.3	Materials and methods.....	84
3.3.1	Animal samples	84
3.3.2	Molecular detection of influenza A virus by qRT-PCR.....	86
3.3.3	Virus isolation	88
3.3.4	Sequencing analysis	88
3.3.5	Phylogenetic and Molecular Analysis	89
3.4	Results.....	90
3.5	Discussion	102
3.6	Conclusion	104
References		106
4. Discusión, conclusiones y recomendaciones		111
4.1	Discusión	111
4.2	Conclusiones	114
4.3	Recomendaciones	115
4.4	Perspectivas	117
A. Anexo: Secuencias de los aislamientos obtenidos.....		119
B. Anexo: Análisis filogenético extendido.....		131
C. Anexo: Análisis de similitud de secuencias		135
D. Anexo: Relación de cepas utilizadas en el análisis filogenético		137

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura del virus de influenza A.....	7
Figura 1-2: Huéspedes naturales y accidentales del virus de influenza A.	9
Figura 1-3: <i>Drift</i> o deriva antigénica.	11
Figura 1-4: <i>Shift</i> o rearreglo (<i>reassortment</i>).	12
Figura 1-5: Evolución de los virus de influenza A en cerdos en Europa.	16
Figura 1-6: Evolución de los virus de influenza A en cerdos en Norte América.	17
Figura 1-7: Evolución de los virus de influenza A en cerdos en Asia.....	19
Figura 1-8: Origen de la cepa H1N1pdm09 del virus de influenza A.	21
Figura 1-9: Tipos del virus de influenza presentes en cerdos en Colombia.....	34
Figura 2-1: Diagrama de actividades para la obtención y preparación de las muestras de tejido pulmonar en cerdos.	63
Figura 2-2: Diagrama de actividades para la realización del aislamiento.	66
Figura 2-3: Confirmación de los aislamientos positivos por medio de RT-PCR.....	69
Figura 3-1: Amplification of HA gene first segment.	92
Figura 3-2: Amplification of HA gene second segment.....	92
Figura 3-3: Amplification of NA gene first segment	92
Figura 3-4: Amplification of NA gene second segment.....	93
Figura 3-5: Amplification of M gene	93
Figura 3-6: Amplification of NS gene.....	93
Figura 3-7: Phylogenetic analysis for HA gene	95
Figura 3-8: Phylogenetic analysis for NA gene	97
Figura 3-9: Phylogenetic analysis for M gene	99
Figura 3-10: Phylogenetic analysis for NS gene	101

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Proporción de muestras de acuerdo con el censo porcino de 2014.	62
Tabla 2-2: Primers y sondas usados para la detección y caracterización de virus de influenza A mediante qRT-PCR.	65
Tabla 2-3: Primers usados para la amplificación de un segmento del gen M por RT-PCR.....	67
Tabla 2-4: Resultados obtenidos en el análisis por medio de qRT-PCR.	68
Table 3-1: Distribution of samples for Second and Third Phases	85
Table 3-2: Primers and probes for the detection influenza A viruses.....	87
Table 3-3: Primers for the amplification of HA, NA, M and NS genes.....	89
Table 3-4: Distribution of samples and results of influenza A virus detection during the exploratory phase.	90
Table 3-5: Results of influenza A virus detection during second and third phases.....	91
Table 3-6: Molecular detection of influenza A virus by geographic regions	91

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
α -2,3	Receptor de ácido siálico en conformación alfa 2,3
α -2.6	Receptor de ácido siálico en conformación alfa 2,6
μ L	Microlitro (10^{-6} litros)
μ M	Micromolar (10^{-6} molar)
μ g	Microgramo (10^{-6} gramos)

Superíndices

Superíndice	Término
TM	Trade Mark, Marca registrada
®	Marca registrada

Abreviaturas

Abreviatura	Término
mM	Milimolar (10^{-3} molar)
mL	Mililitros (10^{-3} litros)
nm	Nanómetro (10^{-9} metros)
khz	Kilohertz (10^3 kilos)
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PB2	Polimerasa básica 2
PB1	Polimerasa básica 1
PA	Polimerasa ácida
HA	Hemaglutinina
NP	Nucleoproteína
NA	Neuraminidasa
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de poro de iones
NS1	Proteína no estructural 1
NS2/NEP	Proteína no estructural 2/proteína de exportación nuclear
RNP	Complejo de ribonucleoproteína
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
SPF	Libres de patógenos específicos
MDCK	Madin Darby Canine Kidney, células de riñón canino
H1N1pdm09	Virus H1N1 pandémico de 2009
EA	Linaje euroasiático tipo aviar

Abreviatura Término

<i>TRIG</i>	Linaje de triple rearreglo norteamericano
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>pH</i>	Concentración de iones de hidrógeno H ⁺
<i>CRP</i>	Complejo respiratorio porcino
<i>Kb</i>	Kilobase (1000 pare de bases)
<i>Cm</i>	Centímetro (10 ⁻² metros)
<i>PBS</i>	Solución búfer fosfato salino
<i>°C</i>	Grados celsius
<i>Cp</i>	Crossing point, punto de cruce
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>HA</i>	Hemaglutinación

Introducción

La influenza en cerdos es una enfermedad respiratoria cuyos reportes iniciales coinciden con los de la pandemia de la gripe española de 1918, cuando se relacionó la aparición de signos respiratorios en los cerdos con la manifestación de la enfermedad entre los humanos, demostrándose la significancia epidemiológica de los flujos de transmisión inter-especie (Shope, 1958; Taubenberger, 1997). El curso de la enfermedad en los cerdos afectados se caracteriza por tener una baja mortalidad de cerca del 1% y una rápida propagación entre los animales, lo cual favorece que la morbilidad pueda llegar hasta el 100%, ocasionando un impacto importante en los sistemas de producción asociado a pérdidas económicas representadas por una disminución en la tasa de crecimiento, pérdida de peso y costos en el tratamiento médico de enfermedades primarias y secundarias. Las principales vías de transmisión son los aerosoles, fómites contaminados y el contacto directo con las secreciones de los individuos enfermos. Los primeros signos que se manifiestan son una fiebre de 40.5°C, letargia, anorexia y se pueden observar descargas nasales y oculares (Kappor y Dhama, 2014; Neira, Rabinowitz, Rendahl, Paccha, Gibbs, Torremorell, 2016). Otros signos característicos que se asocian a esta enfermedad son la dificultad para respirar y la tos, esta última relacionada con una bronquitis y bronquiolitis extensa. La recuperación de los cerdos es muy rápida y puede tomar entre 6 y 7 días después del inicio de la infección (Janke, 2013; Taubenberger y Morens, 2008), pero se puede prolongar cuando existe la presencia de otros agentes que interactúan y se asocian con el complejo respiratorio porcino (CRP) (Hansen et al., 2010; Mancipe, Ramírez, Vera y Jaime, 2014). Aunque existen múltiples factores de riesgo que determinan la dinámica de la infección, como las condiciones de manejo, la densidad de la población, el tamaño y la estructura de la producción (Torremorell, Allerson, Corzo, Diaz y Gramer, 2012), la enfermedad se puede manifestar en animales de todos los grupos etarios dentro de la granja, especialmente en cerdos en etapa de pre-cebo, en los cuales se ha demostrado una mayor incidencia. (Kothalawala, Toussaint y Gruys, 2006; Loeffen, Hunneman, Quak, Verheijden y Stegeman, 2009).

El agente causal es un virus ARN de cadena sencilla y polaridad negativa que hace parte de la familia *Orthomyxoviridae*, dentro del género *influenzavirus A* (Baltimore, 1971). Otros tipos de virus de influenza incluyen el B, el C y el D. Sin embargo, los virus de influenza A son los más importantes desde el punto de vista clínico y han sido causantes de varias epidemias en humanos y brotes de influenza en animales domésticos a lo largo de la historia (Memorandum WHO, 1980; Webster, Bean, Gorman, Chambers y Kawaoka, 1992). El virus de influenza es envuelto, tiene un diámetro de 80-120 nm y se caracteriza por poseer un genoma de 8 segmentos que codifican para 11 o 12 proteínas (Harris et al., 2006; Shaw y Palese, 2013), dentro las cuales se encuentran dos glicoproteínas de superficie, la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA) (Dangi y Jain, 2012), que se proyectan a través de la envoltura viral y se encargan de interactuar con los receptores de la célula huésped (Fanning, Reid y Taubenberger, 2000; Mair, Ludwig, Herrmann y Sieben, 2014). El gen de la proteína de matriz que codifica para dos proteínas, M1 (proteína de matriz) y la proteína de poro de iones (M2) (Ito, Gorman, Kawaoka, Bean y Webster, 1991). De otra parte, los genes que codifican para las proteínas PB1 (polimerasa básica 1), PB2 (polimerasa básica 2) y PA (polimerasa ácida), que contribuyen junto con la nucleoproteína (NP), en la formación del complejo ribonucleoproteína (RNP) que cubre y protege los segmentos de ARN viral (Kukol y Hughes, 2014). Adicionalmente, estos virus codifican las proteínas no estructurales NS1 (proteína no estructural 1) y NS2/NEP (proteína no estructural 2/proteína de exportación nuclear) que cumplen funciones de apoyo durante la replicación del virus y de antagonismo en la respuesta inmune del huésped (Xu, Zhong, Madrahimov, Helikar y Lu, 2014). Con respecto a los genes que codifican para el complejo polimerasa, recientemente se han detectado nuevas proteínas accesorias, PB1-F2, PB1-N40, PA-X, codificadas solo por algunos virus de influenza (Rodriguez-Frandsen, Alfonso y Nieto, 2015; Solbak et al., 2013; Vasin et al., 2014).

Tomando en cuenta las características moleculares y antigénicas de las glicoproteínas de superficie, los virus de influenza se pueden clasificar en 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA, siendo reconocidos hasta el momento en huéspedes tanto mamíferos como aviares (Klenk, 2014; Webster et al., 1992; Wu, Wu, Tefsen, Shi y Gao, 2014). Dentro de éstos, los subtipos de virus de influenza H1N1, H1N2 y H3N2 pueden ser considerados como los más prevalentes y aquellos que frecuentemente son asociados con infecciones en los cerdos (B. Olsen et al., 2006; Webster, 1998; Wu et al., 2014; Yoon, Webby y

Webster, 2014). A su vez, debido a las características estructurales del epitelio de las vías aéreas y el tracto respiratorio en los cerdos, estos juegan un papel importante en la dinámica de transmisión de los virus de influenza, ya que pueden expresar los receptores de ácido siálico en conformación α -2,3 y α -2,6, los cuales se relacionan preferencialmente con el reconocimiento de virus de influenza de origen aviar o de influenza, de origen humano respectivamente, por lo cual tradicionalmente han sido considerados como “vasos mezcladores” para la generación de nuevos virus de influenza (Ma, Kahn y Richt, 2008; Neumann y Kawaoka, 2015; Scholtissek, 1994; Suzuki et al., 1997; Wang et al., 2015)

Teniendo en cuenta lo anterior y la diversidad genética de los linajes de virus de influenza A en cerdos, la aparición de la cepa pandémica de 2009 (H1N1pdm09) en los humanos y la introducción en la población de cerdos ha representado un cambio significativo, aportando en la dinámica de la variación del virus, convirtiéndose en el subtipo de mayor prevalencia y circulando simultáneamente con otras cepas endémicas alrededor del mundo (Kong et al., 2015; Vijaykrishna et al., 2010). Esta situación, sumado al hecho de que se han demostrado rearreglos con componentes genéticos de virus de influenza del tipo H1N1pdm09, tanto en cerdos como en humanos, resalta la importancia de diseñar y llevar a cabo estudios de vigilancia que permitan conocer las características moleculares de los virus que circulan en un área geográfica en particular y anticipar la aparición de aquellos virus de influenza A que puedan representar un potencial riesgo pandémico y/o epidémico.

En cuanto a la situación de la influenza en cerdos en Colombia, los primeros estudios establecieron una reactividad serológica a los subtipos H1N1 y H3N2 durante 1971-1972 (Hanssen, Hincapié y López, 1977) y hasta 2001 (Cucaita, 2005; Mogollon, Rincón, Preciado y Cepeda, 2003; Moscoso y Neira, 2001), pero solo en 2008-2010 se realiza el primer aislamiento de cepas de campo del tipo H1N1 clásico y H1N1pdm09 a partir de cerdos provenientes de las tres principales regiones geográficas productoras de cerdos en Colombia (Ramírez-Nieto, 2012). Posterior a esto y de acuerdo con resultados de estudios realizados por nuestro grupo de investigación que muestran una predominancia del virus del tipo H1N1pdm09 tras su aparición y considerando la existencia previa y/o concomitante con virus del subtipo H1N1 clásico y H3N2 en el país, se establece la necesidad de caracterizar los virus de influenza A que continúan circulando en cerdos

después de la aparición de esta cepa pandémica y conocer los cambios moleculares que puedan haber surgido como consecuencia de los mecanismos de variación propios de los virus de influenza y que puedan haber sido propiciados por la aparición de esta nueva cepa del virus en el país. Los resultados obtenidos brindarán información importante en el contexto nacional, que permitirá conocer la dinámica de estos agentes virales con el fin de establecer medidas que contribuyan al control y/o prevención de acuerdo con las implicaciones epidemiológicas y en la salud pública derivadas de la presencia del virus de influenza en poblaciones tanto humanas como de animales.

1.Marco teórico

1.1 Generalidades del virus de influenza A en cerdos

El virus de la influenza ha sido causante de múltiples pandemias y epidemias a lo largo de la historia de la humanidad, manifestándose como una enfermedad con una alta morbilidad y una mortalidad variable que puede verse incrementada con la introducción de variantes antigénicas y moleculares del virus en una población susceptible (Rivero y Carbonetti, 2016; Taubenberger, 1997). Los mecanismos de variación inherentes se traducen en una gran capacidad de adaptación, permitiendo la evasión de la respuesta inmune y el cruce de la barrera entre diferentes especies (Jones, Koçer y Webster, 2013; Richard, de Graaf y Herfst, 2014). Tales características reflejan el riesgo potencial para la salud pública y la sanidad animal, como se evidenció en 1918 durante la pandemia de la gripe española que ocasionó alrededor de 50 millones de muertes a nivel mundial (Taubenberger, 1997) y durante 2009 por la aparición del virus H1N1pdm09 que afectó a la población humana y tuvo un impacto significativo en la salud de los porcinos (Vijaykrishna, et al., 2009; Jhung et al., 2011).

En cuanto a la influenza A en cerdos, esta es una enfermedad altamente contagiosa que presenta una alta morbilidad y un curso agudo, ocasionando fiebre y signos respiratorios entre los que se incluyen descargas nasales y oculares, dificultad y espasmos al respirar (Kappor y Dhama, 2014). Esta enfermedad se asocia con una disminución en la tasa de crecimiento y una pérdida de peso en los cerdos afectados, representando uno de los mayores desafíos en los sistemas de producción porcina (Kothalawala et al., 2006; Loeffen et al., 2009). En algunas condiciones la enfermedad puede ser endémica y a menudo los animales pueden manifestar una infección subclínica que asociada con otros agentes virales y bacterianos resulta en una agudización de los signos clínicos (Janke, 2013; Pomorska-Mól, kwit, Markowska-Daniel, Kowalski y Pejsak, 2014; Taubenberger y Morens, 2008).

1.1.1 Etiología

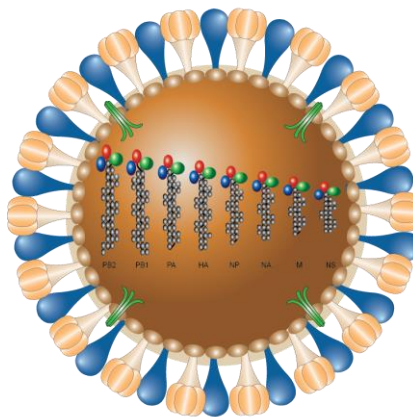
El virus de influenza posee un diámetro que varía entre 80-120 nm (Hongjung y Ning, 2013) y presenta una envoltura lipídica que deriva de las células del huésped. Se caracteriza por poseer un genoma de tipo ARN con ocho segmentos (representado en la figura 1-1), de cadena sencilla y orientación negativa (Baltimore, 1971) con una extensión aproximada de 13.6 Kb (Ma et al., 2009) y permite la codificación de 11 o 12 proteínas, de las cuales 9 son de tipo estructural (Harris et al., 2006; Shaw y Palese, 2013). Entre estas proteínas, se encuentran aquellas del complejo de la ARN polimerasa que son PB1 (polimerasa básica 1), PB2 (polimerasa básica 2), PA (polimerasa ácida) y recientemente se han detectado nuevas proteínas accesorias PB1-F2, PB1-N40, PA-X que son expresadas solo por algunos virus de influenza (Rodríguez-Frandsen et al., 2015; Solbak et al., 2013; Vasin et al., 2014). Las glicoproteínas de superficie que corresponden a la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) son de tipo estructural, al igual que la nucleoproteína (NP), la proteína de matriz (M1) y la proteína de poro de iones (M2). Así mismo, estos virus pueden codificar dos proteínas no estructurales, NS1 (proteína no estructural 1) y NS2/NEP (proteína no estructural 2/proteína de exportación nuclear)(Dangi y Jain, 2012).

Las proteínas PB2, PB1 y PA son codificadas por los segmentos 1, 2 y 3 respectivamente, se encuentran asociadas al complejo de la rinonucleoproteína (RNP) y los segmentos de ARN virales y confiere la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN al virus (Luytjes, Krystal, Enami, Parvin y Palese, 1989). La NP es codificada a partir del segmento 5 y ejerce una función vital en la regulación de balance entre la transcripción y la replicación durante el ciclo viral (Tarus et al., 2012).

La proteína de matriz M1 es la proteína más abundante del virión, es codificada por el segmento 7 y se encuentra debajo de la bicapa lipídica que forma la envoltura del virus, mediando su interacción con el complejo de la RNP para apoyar el proceso de ensamblaje, fusión de membrana y liberación del genoma viral (Fontana y Steven, 2013; Safo et al., 2014). La proteína M2 también es codificada por el segmento 7, mediante una estrategia de empalme alternativo durante su codificación y es considerada un componente transmembrana que funciona como un canal de iones dependiente de pH que apoya las actividades de entrada del virus, liberación del genoma, ensamblaje y

liberación del virión (Alvarado-Facundo et al., 2015; Elleman y Barclay, 2004; Wang, Takeuchi, Pinto y Lamb, 1993).

Figura 1-1: Estructura del virus de influenza A¹



Adaptado de: (Horimoto & Kawaoka, 2005)

La proteína NS1 es codificada por el segmento 8 y posee múltiples funciones que contribuyen en la replicación y están asociadas con la virulencia durante el proceso de infección. Entre las funciones se encuentran la regulación de la síntesis de ARN, el control del empalme del ARN mensajero, la mejora en el rendimiento de la traducción viral y bloqueo de la respuesta inmune del huésped (Anastasina et al., 2016; Hale, Randall, Ortin y Jackson, 2008; Krug, 2015). La proteína de exportación nuclear (NEP/NS2) es un componente menor del virión que se encarga de mediar la exportación del ARN actuando como intermediario entre el complejo RNP y la maquinaria de exportación de la célula (Hutchinson y Fodor, 2013; O'Neill, Talon y Palese, 1998; Pohl, Lanz y Stertz, 2016).

Las glicoproteínas de superficie viral que son codificadas a partir de los segmentos de ARN virales 4 y 6, son la HA y la NA, que se proyectan a través de la envoltura y cumplen funciones de interacción con los receptores de la célula huésped (Mitnaul et al.,

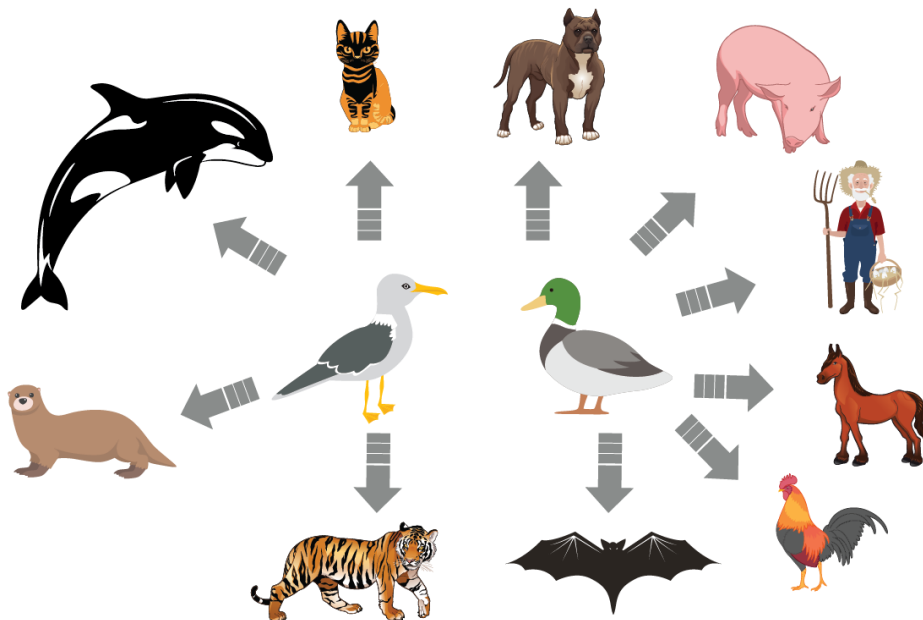
¹ Representación esquemática del genoma del virus de influenza A. Se muestra la organización del genoma ARN de ocho segmentos: 1, PB2: polimerasa básica 2; 2, PB1: polimerasa básica 1;; 3, PA: polimerasa ácida; 4, HA: hemaglutinina; 5, NP: nucleoproteína; 6, NA: neuraminidasa; 7, M: proteína de matriz; 8, NS: proteína no estructural.

2000). En este sentido, la proteína HA, media la entrada del virus a la célula huésped al reconocer los receptores de ácido siálico en conformación α -2,3 o α -2,6 unidos a galactosa (Skehel y Wiley, 2000). La capacidad de un virus en particular de unirse a una o ambas conformaciones del receptor de ácido siálico es considerado como un factor determinante para la restricción de huéspedes característicos de los virus de influenza (Steel y Lowen, 2014; Wang y Palese, 2009). De esta forma, los virus de influenza aviar tienen una preferencia para unirse a los receptores de ácido siálico en conformación α -2,3 (Wang et al., 2015), mientras que los virus de influenza de origen humano son capaces de reconocer la conformación α -2,6 para este receptor (Neumann y Kawaoka, 2015). Debido a la capacidad de expresar ambos tipos de receptores en el epitelio de las vías aéreas, los cerdos juegan un papel importante en la dinámica de transmisión y generación de nuevos virus de influenza, debido a que son susceptibles a infecciones por virus de influenza de origen humano y aviar (Ito y Kawaoka, 2000; Suzuki et al., 1997; de Graaf y Fouchier, 2014)

1.1.2 Ecología

Los virus de influenza A son clasificados en diferentes subtipos basados en las características moleculares y antigénicas de las proteínas HA y NA. Las aves acuáticas juegan un papel importante como reservorios de estos virus y dentro de ellas han sido detectados 16 subtipos de hemaglutininas y 9 subtipos de neuraminidasa, describiéndose la mayoría de combinaciones entre estas proteínas (Munster et al., 2007; B. Olsen et al., 2006). Las aves que pertenecen al orden de los *Anseriformes* (patos, cisnes y gansos) y *Charadriiformes* (gaviotas, entre otros) han sido identificadas como los principales reservorios naturales y se ha establecido que la replicación del virus tiene lugar en las células intestinales de estas aves (Klenk, 2014; Webster et al., 1992).

En la figura 1-2 se representan a los principales huéspedes del virus de influenza A, incluyendo a los humanos, cerdos y equinos (Webster, 1998); dentro de los cuales se

Figura 1-2: Huéspedes naturales y accidentales del virus de influenza A²

Adaptado de: (Zhang et al., 2006)

resalta la importancia de los mamíferos en el ciclo de transmisión. Adicionalmente, los perros (Giese et al., 2008), gatos domésticos (Harder y Vahlenkamp, 2010), félidos carnívoros (tigre, leopardo) (He et al., 2014), carnívoros mustélidos (hurón, visón) (Peng et al., 2015), mamíferos marinos (ballenas, focas) (Groth et al., 2014), camellos, la rata almizclera, el gato de algabia, el perro mapache, la pika y el oso hormiguero han sido descritos como huéspedes accidentales en los que no se establecen cadenas de infección estables (Yoon, Webby y Webster, 2014; Zell, Scholtissek y Ludwig, 2013). Recientemente también se ha reconocido la relevancia de los murciélagos en la ecología de los virus de influenza, ya que en ellos se han caracterizado dos nuevos subtipos de HA (H17, H18) y de NA (N10, N11) (Tong et al., 2012; Tong et al., 2013).

² Esquema representativo de la transmisión del virus de influenza A a diferentes especies a partir de aves acuáticas. Resaltando la importancia en los humanos, cerdos, caballos y aves domésticas; sin embargo, se ha identificado la transmisión a perros, gatos domésticos, carnívoros mustélidos, mamíferos marinos, entre otros.

1.2 Mecanismos de variabilidad molecular

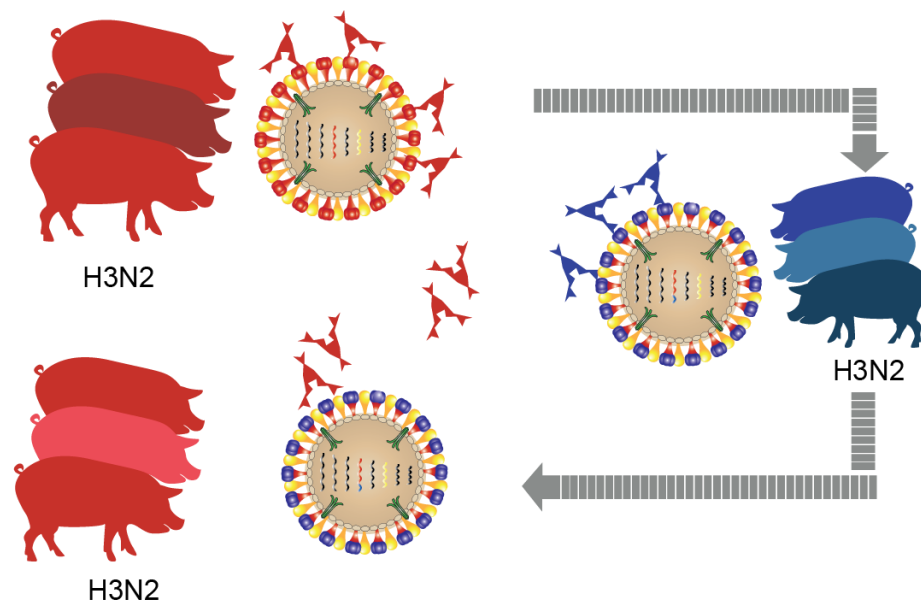
Existen dos mecanismos principales que han permitido la evolución de los virus de influenza a lo largo de la historia, estos son el *shift* (o rearreglos) y el *drift* o deriva antigénica (acumulación de mutaciones), que permiten la adquisición de nuevas adaptaciones y promueven la aparición de una gran variedad de cepas, que desafían constantemente la inmunidad aportada en los programas de vacunación y contribuyen en la generación de virus con potencial pandémico o epidémico (Capua, 2013; Carrat y Flahault, 2007; Greenbaum y Ghedin, 2015; Laursen y Wilson, 2013; Runstadler, Hill, Hussein, Puryear y Keogh, 2013)

1.2.1 *Drift* o deriva antigénica (mutaciones)

El *drift* antigénico es determinado por la acumulación de errores de la ARN polimerasa que no posee un sistema de corrección de lectura y permite que ocurran un mayor número de sustituciones de nucleótidos durante el proceso de replicación viral resultando en mutaciones asociadas a la variabilidad de los virus de influenza (Fiers et al., 1981; Mintern, Guillonau, Turner y Doherty, 2008; D. J. Smith, 2004). Estos cambios se pueden manifestar en cada uno de los genes del virus, pero su mayor impacto se refleja en los genes de las glicoproteínas de superficie HA y NA, consideradas los principales antígenos inductores de la respuesta inmune en el huésped (Brandenburg et al., 2013; Colman, 1994). En este sentido y tal como se muestra en la figura 1-3, la producción de anticuerpos es estimulada a través de la interacción del sistema inmune con estas proteínas, pero los cambios graduales en sus genes llevan a modificaciones que conducen al surgimiento de nuevas variantes antigénicas (Hensley et al., 2009). Cuando estas variantes son introducidas dentro de una población y no pueden ser reconocidas por los anticuerpos previamente sintetizados, pueden ser capaces de iniciar un proceso de infección en animales susceptibles (Laver, Gerhard, Webster, Frankel y Air, 1979). Esto es de gran relevancia cuando se busca inducir una inmunidad mediante el uso de vacunas, ya que es necesario emplear como candidatos aquellos virus capaces de inducir una respuesta inmune que neutralice a las cepas que circulan en ese momento (Air, 2015; Moisset, Pederson y Landry, 2015). Esta falla para la neutralización de los

virus de influenza con nuevas mutaciones puede estar determinada por la introducción de una interferencia estérica en la unión de los anticuerpos (Bizebard et al., 1995), así como por cambios conformacionales que determinan que la unión a los anticuerpos sea energéticamente desfavorable (Fleury et al., 1999) o por la adición de nuevos polisacáridos en las proteínas HA y NA que impide la unión a los anticuerpos neutralizantes (Murphy, Kasel y Chanock, 1972).

Figura 1-3: *Drift* o deriva antigénica³



Adaptado de: (Sandbulte, et al., 2015)

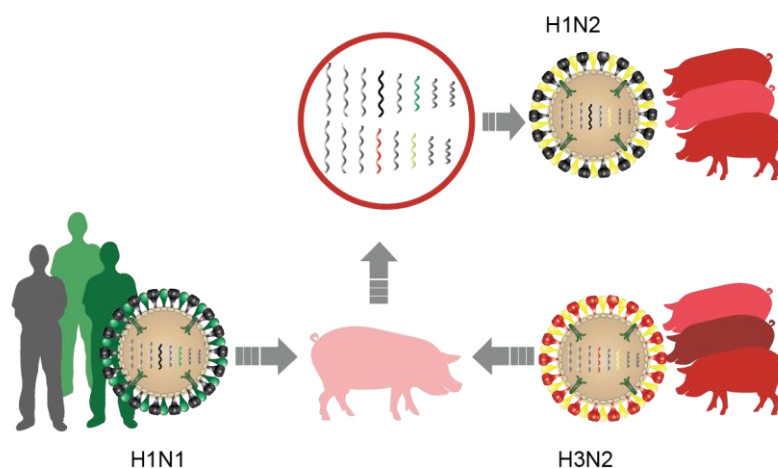
1.2.2 *Shift* (rearreglos)

El proceso de rearreglo o *reassortment* es determinado por la naturaleza segmentada del genoma de los virus de influenza el cual, como se puede observar en la figura 1-4,

³ Representación gráfica del mecanismo de variación asociado al *drift* antigénico que promueve la generación de nuevos cambios en un virus del subtipo H3N2 que inicialmente es reconocido por una población de cerdos, pero al introducirse nuevas variaciones son capaces de evadir la respuesta inmune e iniciar un proceso de infección

puede intercambiar de forma independiente uno o más de sus segmentos, cuando una misma célula es infectada simultáneamente con dos virus diferentes (Vijaykrishna et al., 2015; Zeldovich et al., 2015). Teniendo en cuenta este hecho, es posible que se mezclen genes provenientes de los 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA que se conocen actualmente, para crear virus con características antigénicas, genéticas y fenotípicas diferentes y a pesar que no todos serán viables, se pueden generar virus con la capacidad de replicarse en una nueva especie y adquirir características antigénicas nuevas (Gerber, Isel, Moules y Marquet, 2014; Parrish, Murcia y Holmes, 2015). Las señales de empaquetamiento del genoma dentro del virión juegan un papel importante en el proceso de rearreglo, ya que el intercambio de señales entre dos cepas coinfectantes lleva a un intercambio entre los segmentos genómicos (Essere et al., 2013; Gavazzi et al., 2013). Sin embargo, aunque los rearreglos proveen un mecanismo de evolución rápido para la generación de nuevas cepas, debe existir una adaptación funcional entre los 8 segmentos genómicos para dar origen a virus biológicamente viables (Gerber et al., 2014; Greenbaum y Ghedin, 2015; Zhang et al., 2013).

Figura 1-4: *Shift* o rearreglo (*reassortment*)⁴



Adaptado de: (Sandbulte et al., 2015)

⁴ Representación gráfica del mecanismo de variación asociado al *Shift* o *reassortment* durante un proceso de co-infección con un subtipo H1N1 de origen humano y un subtipo H3N2 de origen porcino, resultando en la generación de una cepa H1N2 capaz de ser transmitida a los cerdos

Como resultado de lo anterior, los dos mecanismos de variación se adaptan mediante una intercomunicación importante entre ellos, por ejemplo, a través de un rearreglo se puede generar un nuevo virus que posea dos características importantes de los virus parentales, o descartar una adaptación que representa un cambio perjudicial para su evolución. Por su parte, las mutaciones pueden aliviar los defectos de adaptación que surgen del desajuste de segmentos después de un rearreglo (Steel y Lowen, 2014). Así mismo, estos cambios pueden resultar en nuevas adaptaciones que permitan cruzar la barrera entre especies (Mehle, Dugan, Taubenberger y Doudna, 2012).

Asociado con estos mecanismos de variabilidad, la susceptibilidad natural de los cerdos a virus de otros orígenes ha demostrado que una situación de coinfección con dos agentes diferentes puede determinar la generación de un virus con características nuevas y por esto son denominados como “vasos mezcladores” (Ma et al., 2008; Scholtissek, 1994), esta hipótesis también es soportada por el hecho de que es posible que en esta especie ocurran eventos de rearreglo entre virus de origen humano, aviar y de cerdo y que una vez generados amplíen el rango de especies susceptibles (Crisci, Mussá, Fraile y Montoya, 2013).

1.3 Evolución de los virus de influenza

1.3.1 Linajes genéticos

El estudio de la composición genética relacionado con la evolución de los virus de influenza que infectan a los cerdos, ha permitido agruparlos en linajes de manera que un virus determinado se pueden comparar y relacionar con virus provenientes de diferentes ubicaciones geográficas, periodos y hospedadores. En este sentido y como resultado del proceso de adaptación aparecen diversos linajes dentro de las especies aviar, humana, porcina y equina. (Pensaert, Ottis, Vandeputte, Kaplan y Bachmann, 1981; Van Reeth, 2007). La formación de linajes o su extinción puede estar influenciada por el aislamiento geográfico de los virus, aunque una situación propicia puede llevar a infecciones trans-especie (Campitelli et al., 1997; Webby et al., 2000; Yu et al., 2008); por otro lado, es posible que la aparición de nuevos subtipos o cepas contribuya a la extinción de otros linajes, lo cual puede ser atribuido a la adquisición de ventajas evolutivas que les

permiten prevalecer a algunos virus de influenza (Bahl, Vijaykrishna, Holmes, Smith y Guan, 2009; Munoz et al., 2016).

Se han descrito alrededor de 69 linajes para los subtipos de HA, 46 linajes para NA y entre 7 y 11 linajes para cada uno de los segmentos internos (Zell et al., 2013). En cuanto a los linajes del virus de influenza en cerdos estos están determinados y caracterizados por la trayectoria evolutiva en cada uno de los continentes (descrito con mayor detalle más adelante), por ejemplo, para el gen HA se pueden mencionar aquellos derivados del linaje porcino clásico, representados por tres clústers o grupos H1 α , H1 β y H1 γ ; también existen dos clústers derivados del virus de influenza estacional humano, denominados H1 δ 1, H1 δ 2; el clúster del virus H1pdm09, y los clústers I, II, III, IV del subtipo H3. Otros linajes importantes se consideran el H1N1 Euroasiático tipo aviar (EA) y el H3N2 de origen humano (A/Hong Kong/1/68), entre otros (Vijaykrishna et al., 2011; Vincent, Lager, & Anderson, 2014).

1.3.2 Trayectoria evolutiva del virus de influenza A en cerdos

La influenza porcina es una enfermedad cuyos inicios están estrechamente relacionados con el virus de influenza humana responsable de la pandemia de la gripe española en el año 1918, cuando se evidenció que los cerdos enfermaron al mismo tiempo que los humanos (Zell, Bergmann, Krumbholz, Wutzler y Dürrwald, 2008). El primer aislamiento del virus de influenza A en cerdos se logró en el año 1930 en los Estados Unidos y permitió su caracterización posterior como un subtipo H1N1 (Brockwell-Staats, Webster y Webby, 2009). A partir de este momento y hasta el año 1979 todos los aislamientos del virus de influenza, incluso en Europa, fueron reconocidos y caracterizados como H1N1 del linaje “porcino clásico” (Zimmer y Burke, 2009).

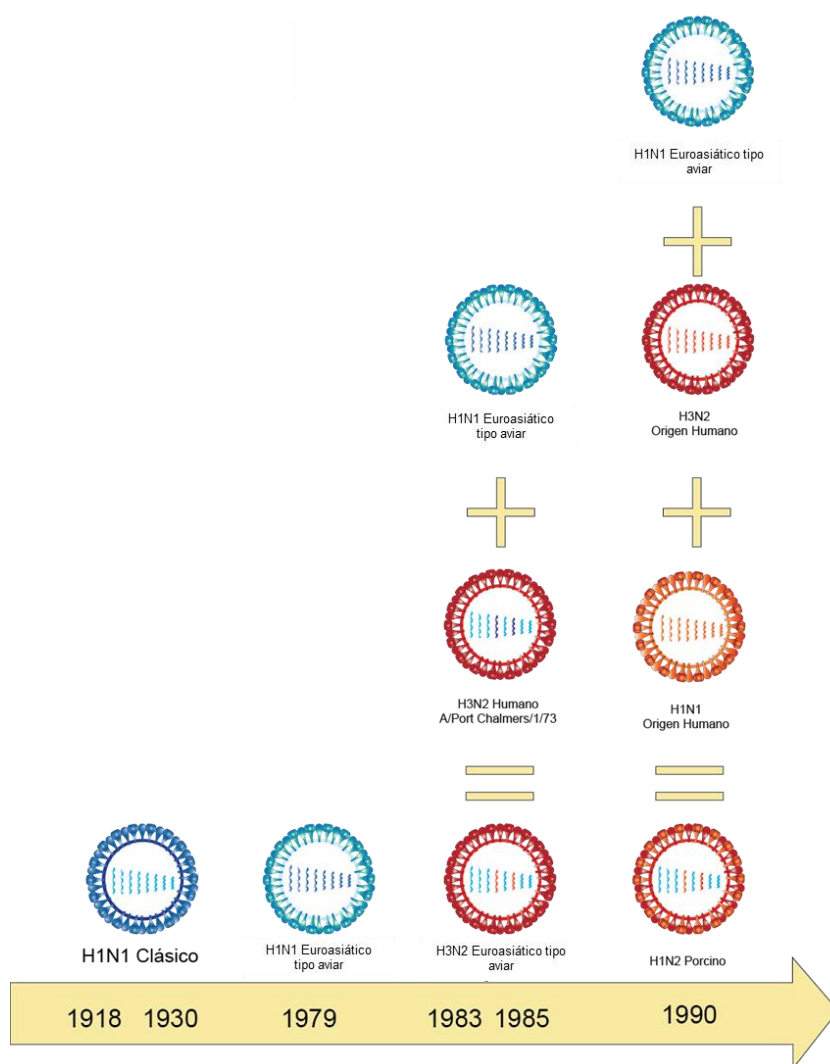
En 1979, en el continente europeo se reconoce un nuevo subtipo H1N1 (A/swine/Belgium/1/79, A/swine/Belgium/2/79) durante un brote en Bélgica y el análisis genético de este virus reveló que todos los segmentos estaban estrechamente relacionados con virus de influenza aviar (A/duck/Alberta/76, A/duck/Bavaria/77) (Pensaert et al., 1981). Este virus se propagó rápidamente en la población de cerdos de Europa, estableciendo el linaje euroasiático de tipo aviar (EA) que reemplazo el linaje

clásico que era predominante desde su primera detección en Europa en 1959 (Webster, Webby y Perdue, 2011). Entre los años de 1983 y 1985 los virus de influenza porcina del subtipo H3N2 aparecieron en Europa, los cuales resultaron del rearreglo entre el virus H1N1 de tipo aviar y una cepa H3N2 de influenza estacional humana (A/Port Chalmers/1/73); los virus generados poseían los genes HA y NA de la cepa humana, mientras que los seis segmentos restantes provenían del virus de origen aviar (Campitelli et al., 1997; Hasebrouck y Pensaert, 1988). En Gran Bretaña, se observó la aparición del linaje H1N2 porcino de tipo humano durante los años 90 (A/swine/Scotland/410440/94, A/swine/England/438207/94, A/swine/England/690421/95, entre otros), surgiendo a partir de múltiples rearreglos entre el gen HA de los virus H1N1 estacionales humanos, el gen NA de los virus H3N2 de influenza estacional humana y los segmentos genómicos internos de los virus H1N1 de tipo aviar (Brown, Harris, McCauley y Alexander, 1998). La circulación de estas cepas y el surgimiento de nuevos subtipos se encuentran representados en la figura 1-5.

Por otro lado y como se muestra en la figura 1-6, el linaje H1N1 porcino clásico permaneció relativamente estable por aproximadamente 70 años en Norte América, periodo durante el cual se pudieron detectar anticuerpos contra el virus H3N2 humano en cerdos, sin comprobarse su establecimiento dentro de esta especie (Chambers, Hinshaw, Kawaoka, Easterday y Webster, 1991); sin embargo, en el año 1998 la situación cambia con el surgimiento de nuevos virus producto de rearreglos que llevaban los genes H3 y N2 de los virus de influenza humana contemporáneos (Zhou et al., 1999). De esta forma, en Norte América tienen lugar los eventos de doble rearreglo entre genotipos de cerdo y humano (A/swine/North Carolina/35922/98) y de triple rearreglo entre genotipos de cerdo, humano y aves (A/swine/Minnesota/593/99, A/swine/Iowa/569/99) (Webby et al., 2000). A pesar que los virus de doble rearreglo desaparecieron eventualmente, el virus H3N2 de triple rearreglo se estableció como un linaje importante al diseminarse entre los cerdos de Norte América a partir de 1998 y hoy en día continua siendo prevalente en varias regiones del mundo (Olsen, 2002; Liu et al., 2012). Estos virus se caracterizan por poseer un arreglo (cassette) de genes internos de triple rearreglo (también conocido como cassette TRIG, triple reassortant internal genes, ya que contiene genes procedentes de cepas de origen humano (HA, NA y PB1) de aves (PB2 y PA) y de cerdos (NP, M, NS). Los virus de triple rearreglo poseen ventajas evolutivas en comparación con los virus del linaje clásico, esto se debe en gran medida a que son más propensos a los rearreglos,

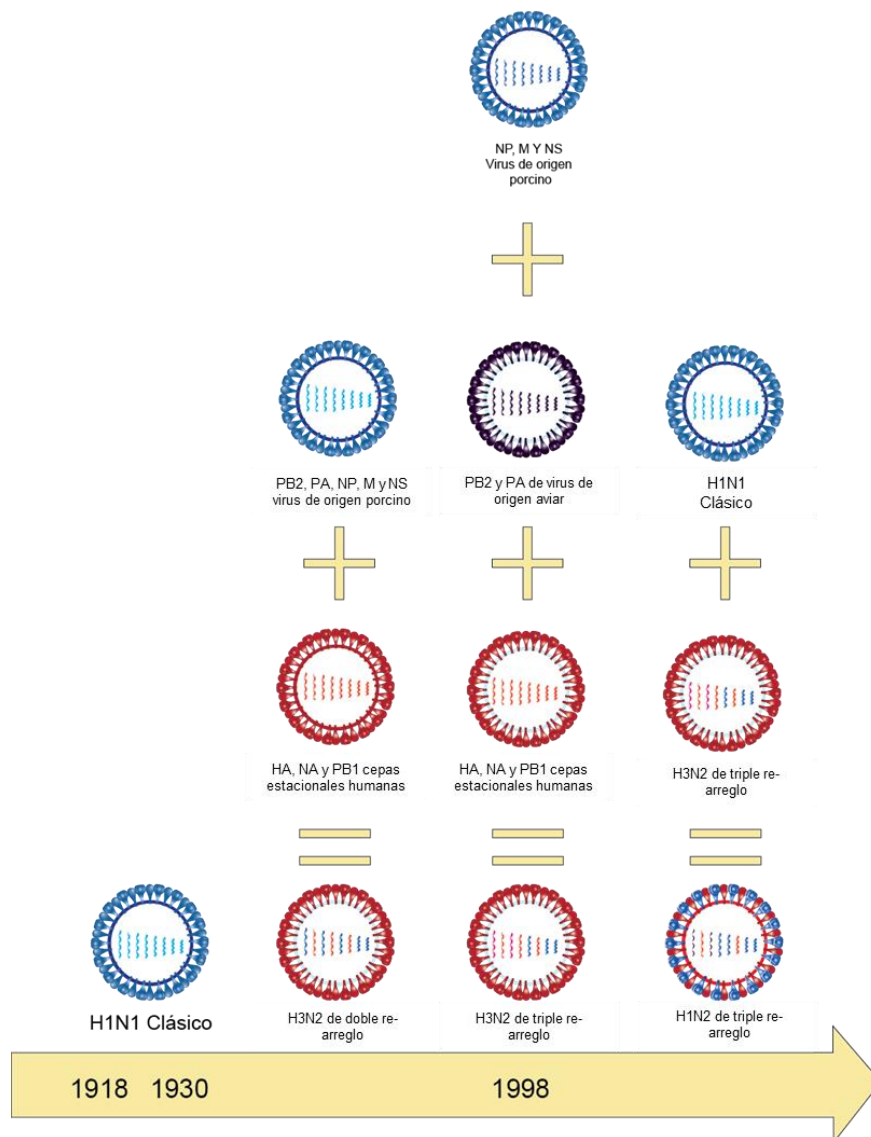
posiblemente debido a que la conformación (cassette) TRIG soporta eficientemente la replicación cuando se combina con diversos genes de HA y NA (Kitikoon et al., 2012; Ma et al., 2010). Posteriormente, se dió origen a un subtipo H1N2 (A/swine/Indiana/9K035/99), que fue producto del rearreglo entre el virus H3N2 de triple rearreglo y el subtipo H1N1 clásico porcino (Karasin et al., 2002).

Figura 1-5: Evolución de los virus de influenza A en cerdos en Europa⁵



Adaptado de: (Taubenberger y Kash, 2010)

⁵ Esquema descriptivo de los virus de influenza A en Europa, representado el surgimiento del virus H1N1 clásico, H1N1 EA, H3N2 EA, entre otros.

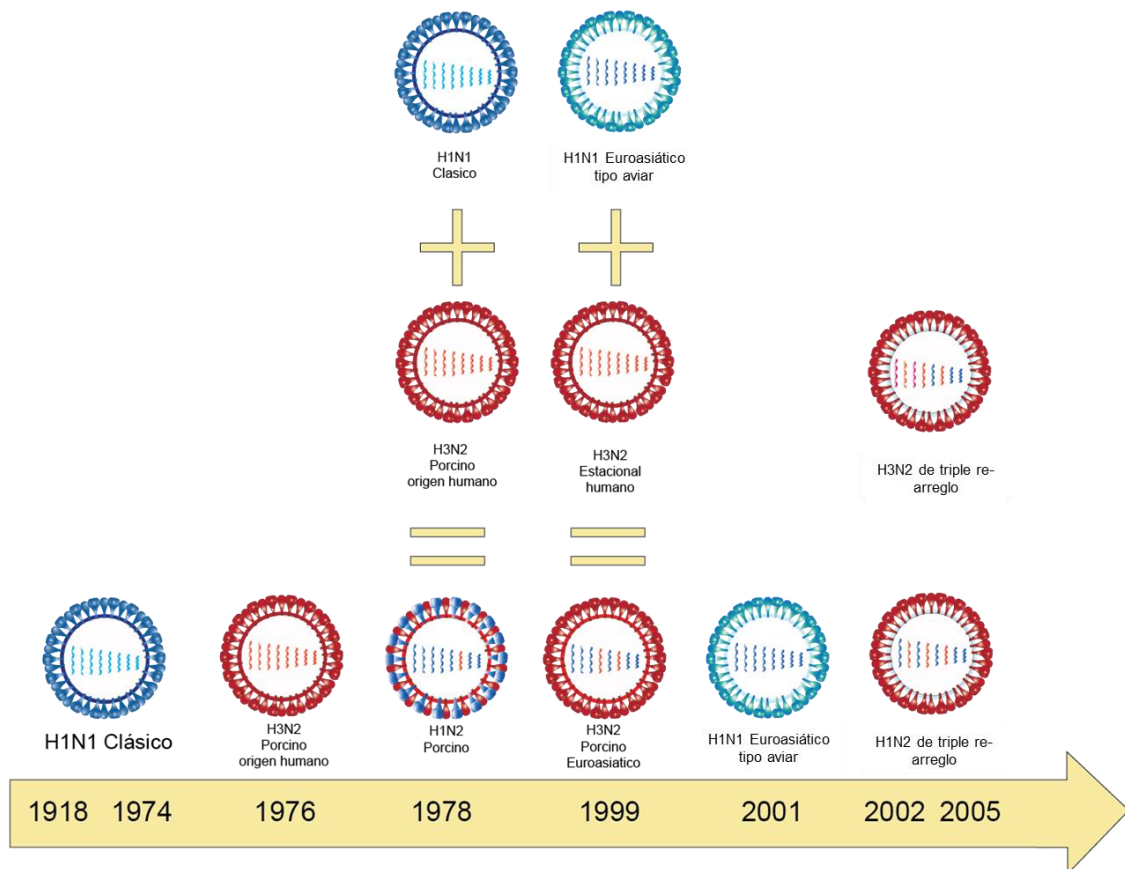
Figura 1-6: Evolución de los virus de influenza A en cerdos en Norte América⁶

Adaptado de: (Lorusso, Vincent, Gramer, Lager y Ciacci-zanella, 2013)

En el continente asiático se ha podido caracterizar cada uno de los linajes de mayor prevalencia dentro de Europa y Norte América. Durante el periodo de 1918 y 1919 se describió el virus H1N1 porcino clásico como causante de una gran mortalidad en la

⁶ Representación gráfica de la trayectoria de los virus de influenza A en Norte América, destacando la caracterización inicial del virus H1N1 porcino clásico entre 1930 hasta 1997, el surgimiento de los virus de doble y triple re-arreglo en 1998 y el surgimiento de nuevas variantes y subtipos a lo largo de los años

población de cerdos de varias ciudades de China (Shortridge, 1992), pero el primer aislamiento de este subtipo en Asia se logró durante 1974 (A/swine/Hong Kong/1/1974) (Shortridge, Webster, Butterfield y Campbell, 1977), y fue detectado en China de forma predominante durante mucho tiempo (Kupradinum et al., 1991; Zhu et al., 2013). Durante la década de los 70, en Hong Kong, se comprueba la transmisión desde los humanos hacia los cerdos de un subtipo H3N2 (A/swine/Hong Kong/1/1976, A/swine/Hong Kong/3/1976, entre otros) (Yu et al., 2008), el cual ha sido detectado constantemente desde 1976 hasta 2011 en varios países de Asia (Shortridge y Webster, 1979; Vijaykrishna et al., 2011), sin embargo, la mayoría de variantes del subtipo H3N2 de origen humano han tenido dificultad en establecerse en la población porcina, llegando a convertirse en eventos transitorios de transmisión de humanos a cerdos (Zhu et al., 2013). Durante un brote de influenza porcina reportado en Japón en 1978 se pudo detectar un subtipo H1N2 (A/swine/Kanagawa/1/1978, A/swine/Kanagawa/2/1978), que se caracterizaba por poseer el segmento N2 del virus de influenza porcina H3N2 de origen humano y los segmentos restantes asociados a virus H1N1 clásico porcino (Sugimura, Yonemochi, Ogawa, Tanaka y Kumagai, 1980). Por otro lado, durante el año 1999 fue detectado un nuevo virus de influenza H3N2 en Hong Kong (A/Hong Kong/1774/1999), este fue caracterizado en varios países de Asia procedente de Europa y se determinó mediante análisis filogenéticos que surgió del rearreglo entre el virus H3N2 de influenza estacional humana (A/Port Chalmers/1/1973) y un virus H1N1 de origen aviar (Gregory et al., 2001; Vijaykrishna et al., 2011); no obstante, el primer aislamiento del subtipo H1N1 de tipo aviar se registró en Hong Kong a principios de 2001 (A/swine/Hong Kong/8512/2001) (Smith et al., 2009) y en un lapso de 4 a 5 años reemplazó al subtipo H1N1 clásico, de forma similar a lo ocurrido en Europa durante los años 80 (Brown, 2000). De igual forma, los subtipos H3N2 (A/swine/Korea/CAS05/2004, A/swine/Korea/CAS07/2005, entre otros) y H1N2 (A/swine/Kyounggi/0981/03) de influenza porcina del linaje de triple rearreglo norteamericanos también han podido ser caracterizados en Asia desde el año 2002 (Jung y Chae, 2004; Pascua et al., 2008; Zhu et al., 2013). La presencia de estas cepas se encuentra descrita en la figura 1-7. Es importante resaltar que los rearreglos entre virus del linaje de triple rearreglo norteamericano y los virus del linaje euroasiático tipo aviar se han reportado en varias oportunidades en Asia, sugiriendo que este lugar fue el origen probable para la cepa H1N1 pandémica de 2009 (Steel y Lowen, 2014).

Figura 1-7: Evolución de los virus de influenza A en cerdos en Asia⁷

Adaptado de: (Medina y García-Sastre, 2011)

1.4 Pandemia por virus de influenza en el 2009

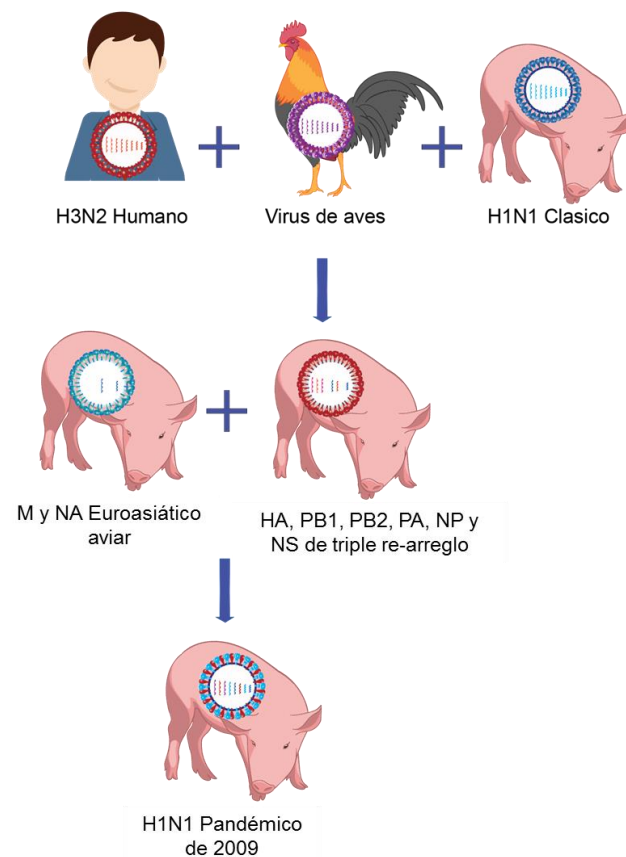
Los primeros reportes del virus H1N1pdm09 en humanos se presentaron en Abril de 2009 en México y California y posteriormente en Texas (USA) (Jhung et al., 2011). Esta fue considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la primera

⁷ Ilustración descriptiva de la presencia del virus de influenza A en Asia, mostrando la presencia de los subtipos H1N1, H1N2, H3N2 de diferentes orígenes y linajes en este continente. Resaltando la presencia del virus H1N1 porcino clásico, H1N1 EA y las cepas de triple rearreglo norteamericano

pandemia causada por el virus de influenza en 41 años desde 1968 (World Health Organization, 2009). Posteriormente, este virus se propagó rápidamente alrededor del mundo, reportándose en Australia (Bishop, Murmane y Owen, 2009), China (Cao et al., 2009; Wu et al., 2010), España, Reino Unido, Alemania y Francia (Nicoll y Coulombier, 2009) y en otros países de Latinoamérica como Argentina (Echavarría et al., 2010), Chile (Riquelme et al., 2010), Brasil (Watanabe et al., 2011) y Colombia (Rey-Benito, Castro-Jiménez y Castillo-Pabón, 2009).

La primera transmisión hacia los cerdos se reportó durante un brote en una granja ubicada en Alberta (Canadá); donde los animales manifestaron signos de una enfermedad de “tipo influenza” y el virus pudo ser detectado molecularmente mediante análisis de RT-PCR. Asimismo, se estableció que la fuente del virus era de origen humano, concretamente a partir de un trabajador que había regresado recientemente de México (Howden et al., 2009). Este evento de transmisión pudo ser detectado en muchas poblaciones de cerdos alrededor del mundo, en donde este virus se volvió endémico y actualmente continua circulando con cepas de diferentes orígenes (Deng et al., 2012; Gray et al., 2012; Moreno et al., 2010; Njabo et al., 2012; Schaefer et al., 2011; Sreta et al., 2010)

A pesar de que aún no está completamente claro el origen del virus H1N1pdm2009, se sabe que es producto del rearreglo entre virus de influenza de dos linajes independientes, el linaje de triple rearreglo norteamericano y el linaje EA (Smith et al., 2009). Como se describe en la figura 1-8, los análisis genéticos permitieron demostrar que la cepa pandémica poseía los genes que codifican para las proteínas M y NA de un virus del linaje EA, mientras que los segmentos restantes (HA, PB1, PB2, PA, NS y NP) provenían de un virus del linaje de triple rearreglo norteamericano (Garten et al., 2009).

Figura 1-8: Origen de la cepa H1N1pdm09 del virus de influenza A⁸

Adaptado de: (Neumann, Noda y Kawaoka, 2009)

Inicialmente éste virus fue denominado como de “influenza porcina” debido al origen filogenético, ya que los precursores más cercanos circularon en la población de cerdos durante mucho tiempo (Trifonov, Khiabanian, Greenbaum y Rabadan, 2009); no obstante, se ha comprobado que no todos los casos de influenza pandémica en humanos estuvieron asociados con un contacto con los cerdos y además la rápida propagación alrededor del mundo puede ser explicada por la movilización de personas, más que por el transporte de animales hacia diferentes regiones (Khan et al., 2009; Lange et al., 2009; Warren, Bell y Budd, 2010). Por otro lado, existe evidencia que sugiere que el flujo de

⁸ Esquematización del origen molecular de la cepa H1N1pdm09 del virus de influenza A, describiendo los eventos de rearreglo entre una cepa del linaje TRIG norteamericano y un virus de linaje EA

transmisión pudo haber sido de los humanos hacia los cerdos, en lugar del sentido contrario (Nelson et al., 2014; Zhu et al., 2015). Un estudio publicado en 2012 resaltó este hecho, ya que mediante análisis filogenético a gran escala de las secuencias genómicas de los virus H1N1pdm09 detectados en muestras recolectadas durante 2009-2011, se identificaron al menos 49 eventos de transmisión de humanos hacia los cerdos. Igualmente, se identificaron al menos 23 introducciones de virus de influenza estacional de los subtipos H1 y H3 en la población mundial de cerdos desde 1990 (Nelson, Gramer, Vincent y Holmes, 2012). Con base en lo anterior, el papel de los humanos en la ecología de estos virus ha llevado a que sean considerados, al igual que los cerdos, como posibles “vasos mezcladores” intermediarios para la generación y transmisión de virus, en este caso a partir de los humanos hacia los cerdos (Nelson y Vincent, 2015).

1.5 Eventos postpandemia

Teniendo en cuenta la importancia que tuvo el surgimiento del subtipo H1N1pdm09 por la complejidad en la composición de su genoma, que resultó en la aparición de un virus con características únicas que afectó tanto a la población humana como a los cerdos y su eficiencia en la transmisión y diseminación que determinó que la circulación simultánea de esta cepas y diversas cepas endémicas permitiera la generación de múltiples rearreglos, representando una mayor diversificación de los linajes de influenza porcina (Kong et al., 2015; Qu et al., 2011; Zhu et al., 2011). Teniendo en cuenta esto, a continuación, se describen algunos aspectos de relevancia ocurridos posteriormente a la aparición del virus H1N1pdm09 que demuestran el efecto que tuvo su aparición en diferentes partes del mundo teniendo como eje central los virus de influenza en cerdos:

1.5.1 Norte América

Después de la detección inicial del virus H1N1pdm09 en Canadá se logró la caracterización del virus aislado en cerdos, mostrándose una gran diversidad genética, hecho que puede ser explicado por las múltiples transmisiones del virus desde los humanos hacia los cerdos, representando un gran impacto en la evolución y epidemiología de los virus de influenza (Weingartl et al., 2010). En un artículo publicado

en 2011 se presentan resultados del estudio de los virus de influenza que circulaban en 2009 en varias poblaciones de cerdos en Canadá, en donde se pudieron caracterizar algunos virus que poseían los genes HA y NA procedentes del linaje clásico de influenza porcina, junto con la conformación de genes internos del linaje de triple rearreglo. Igualmente, se pudieron aislar cepas de virus de influenza del tipo H1N1 descritas como un rearreglo entre un virus del linaje de triple rearreglo y virus de origen estacional humano. El análisis filogenético de estos últimos demostró que existía una homología del gen NS entre uno de los aislamientos obtenidos y la cepa H1N1pdm09, implicando un evento de rearreglo con esta cepa (Nfon et al., 2011). Por otro lado, a finales de 2010 fue posible la detección de un virus de influenza del subtipo H3N2 durante un brote en una granja de cerdos en Canadá. La secuenciación completa de todos los segmentos del genoma y el posterior análisis filogenético permitió determinar que esta cepa fue producto del rearreglo entre el subtipo H1N1pdm09 y una cepa H3N2 del linaje de triple rearreglo (Tremblay et al., 2011).

En Estados Unidos se detectó el subtipo H1N1pdm09 en diversas poblaciones de cerdos (Gray et al., 2012) y posteriormente se ha logrado la identificación de nuevos virus, originados de rearreglos entre diversas cepas de virus de influenza endémicas y pandémicas; por ejemplo, en un estudio realizado durante los años 2009-2010 se detectaron 9 virus del tipo H1N1pdm09 aislados a partir de diferentes brotes en granjas de cerdos de los Estados Unidos, de los cuales 8 poseían los genes HA y NA de virus endémicos y el gen M de la cepa H1N1pdm09, mientras que el resto de genes diferían en su procedencia entre virus endémicos y pandémicos (Ducatez et al., 2011). De igual forma, la caracterización de diversas cepas del tipo H3N2 aisladas durante 2009 y 2010, identificó rearreglos entre virus del subtipo H3N2 del linaje de triple rearreglo y la cepa H1N1pdm09 y la secuenciación completa del genoma demostró que los 17 virus analizados se agrupaban en 6 genotipos que difieren en los genes que provienen de la cepa pandémica (Kitikoon et al., 2012). Otro estudio desarrollado en Minnesota durante 2010 confirma la alta prevalencia de la cepa H1N1pdm09 en la población de cerdos neonatos, ya que el análisis filogenético realizado, demostró de los aislamientos tenían un porcentaje de similitud del 98.9% con el gen HA del virus de influenza pandémica de referencia y un 99.4% de similitud con el gen NA de ésta misma cepa (Allerson, Davies, Gramer y Torremorell, 2013). Durante este mismo año también se caracterizaron otros eventos de rearreglo durante un estudio realizado en una granja de cerdos, ya que el

análisis filogenético de una cepa H1N2 demostró que los genes HA y NA derivaron de un subtipo H1N2 de influenza porcina de origen humano aislado previamente en Norte América (Karasin et al., 2006), los genes NP y M provenían de la cepa H1N1pdm09, mientras que los genes PB2, PB1, PA y NS estaban asociados a los linajes aviar, humano, aviar y porcino, respectivamente (Ali, Khatri, Wang, Saif y Lee, 2012). Nuevos virus del subtipo H3N2 fueron caracterizados durante 2010-2011 en una granja comercial y mediante las pruebas de caracterización molecular se determinó que los 7 aislamientos obtenidos se originaron del rearreglo entre el virus H1N1pdm09 y virus endémicos de los linajes triple rearreglo norteamericano y de influenza estacional humana (Liu et al., 2012). De acuerdo a esto y tomando en consideración los resultados de una investigación desarrollada entre 2009 y 2014 por el departamento de Agricultura de los Estados Unidos, se establece la cocirculación de diferentes virus de los subtipos H1N1 (incluyendo la cepa H1N1pdm09), H1N2 y H3N2 durante este periodo, demostrando una mayor diversificación de los linajes por las continuas introducciones de cepas estacionales humanas a los cerdos y los múltiples eventos de rearreglo entre los virus de influenza de diferentes orígenes (Anderson et al., 2015).

1.5.2 Latinoamérica

En Latinoamérica también se han realizado algunos estudios posteriores a la pandemia de 2009, en los cuales se han podido caracterizar eventos de rearreglo con el subtipo H1N1pdm09 y con una participación significativa de virus de influenza estacional humana. Por ejemplo, en Argentina se realizó la investigación de brotes en dos granjas de cerdos entre 2009 y 2010, permitiendo identificar dos nuevos virus en cerdos (H1N1 y H1N2) y el análisis de la secuencia completa de su genoma determinó que los genes internos proceden del subtipo H1N1pdm09, mientras que los genes HA y NA mostraban similitudes con los virus de influenza estacional detectados en Argentina (Pereda et al., 2011b).

Por otro lado, en Brasil se puede describir una situación similar, ya que durante un monitoreo realizado en una granja durante 2011, se logró la detección de los virus H1N2 con características moleculares nuevas, ya que llevaban los genes HA y NA que

derivaban de virus de influenza estacional humana y los genes internos procedían de subtipo H1N1pdm09 (Schaefer et al., 2015). La circulación simultánea de múltiples cepas se describió en un artículo publicado en 2015 mediante la detección molecular de los subtipos H1N1 (incluyendo la cepa pandémica), H1N2 y H3N2; igualmente se pudo establecer una prevalencia serológica de anticuerpos al virus de influenza porcina del 78.1% para la población muestreada (Ciacci-Zanella et al., 2015). Esta situación es confirmada en otro estudio realizado en Brasil durante 2009-2012, por medio de la identificación de la presencia de los subtipos H3N2, H1N1 y H1N2 en muestras de hisopados traqueales y de pulmones tomados de 131 granjas de cerdos; dentro de los virus detectados se caracterizaron algunos subtipos H3N2 y H1N2 que estaban relacionados molecularmente a virus de influenza estacional humana, pero el gen M y otros genes internos procedían de la cepa H1N1pdm09 (Nelson, Schaefer, Gava, Cantão y Ciacci-zanella, 2015).

En Cuba la vigilancia epidemiológica de estos virus inició en 2010 a través del análisis de 238 muestras de pulmón e hisopados nasales tomadas en granjas y al realizar el análisis filogenético del genoma de los virus detectados durante esta investigación, se demostró que todos los genes derivaron de la cepa H1N1pdm09 (Perez et al., 2013). No obstante, durante un brote registrado en 2010 en una granja de cerdos se detectó un virus del subtipo H1N1 y la caracterización molecular de los segmentos virales concluyó que el gen NA procedía de un virus de influenza endémico de esta región (linaje clásico), en tanto que el resto de genes se correspondían con el virus H1N1pdm09, demostrando que esta cepa surgió como un rearreglo entre estos dos subtipos (Pérez et al., 2015).

La situación en México puede ser descrita en el periodo de transición (entre 2008 y 2009) cuando se pudo evidenciar la detección molecular de virus relacionados a linajes norte americanos. Igualmente se determinó una seroprevalencia del 55% para el subtipo H1N1, 59% para el subtipo H3N2 y 38% para ambos subtipos (López-Robles, Montalvo-Corral, Burgara-Estrella y Hernández, 2014). Sin embargo, el incremento en la diversificación genética de los linajes de influenza porcina en México y también en Chile fue descrita en un estudio realizado durante 2010-2014, en el cual puede ser reconocida la existencia de virus del subtipo H1 asociados al linaje estacional humano, virus del subtipo H3 y cepas H1N1pdm09. Asimismo, se identificaron virus del subtipo H3 asociados a virus de influenza estacional que no habían sido identificados previamente y

se detectaron múltiples introducciones del virus pandémico a la población porcina de Chile y México (Nelson, Culhane, Rovira y Norambuena, 2015).

1.5.3 Europa

Los rearreglos entre virus diferentes a la cepa H1N1pdm09 siguen siendo comunes en este continente, como pudo ser demostrado durante 2009 y 2010, cuando se detectaron virus del subtipo H1N2 en muestras de cerdos de Suecia, las cuales se analizaron mediante secuenciación y estudios de filogenia y se encontró que fueron producto del rearreglo entre un subtipo H1N1 del linaje EA, del cual derivaba su gen HA y un virus H3N2 de influenza porcina del cual procedía su gen NA (Bálint et al., 2009; Metreveli et al., 2011).

Por otro lado, en Noruega, se han llevado a cabo estudios que permitieron la identificación del virus de influenza H1N1pdm09 en la población de cerdos entre los años 2009 y 2010. El análisis serológico y la detección molecular logró determinar que 48 de las 115 pjaras analizadas eran positivas al virus pandémico y los animales afectados mostraban signos respiratorios y una reducción en el desempeño productivo (Grøntvedt et al., 2011, 2013). Otro estudio de seguimiento realizado en este mismo país, describió la persistencia del virus H1N1pdm09 dentro de la población de cerdos analizada, ya que fue posible la detección molecular y/o serológica exitosa de esta cepa, lo cual puede estar asociado a una mayor diseminación del virus entre los cerdos o nuevas introducciones desde los humanos hacia los cerdos (Gjerset et al., 2011).

Italia a su vez, ha sido el foco de varios estudios después del primer reporte del virus H1N1pdm09 en una granja de cerdos (Moreno et al., 2010), logrando durante 2010 la detección de un virus de influenza del subtipo H1N2 como causante de signos clínicos como tos, fiebre anorexia y depresión. La secuenciación completa del genoma y el análisis filogenético de los virus aislados permitió concluir que todos los genes se asociaban al virus H1N1pdm09, a excepción del gen NA que estaba relacionado con un subtipo H1N2 aislado en Suecia e Italia (Moreno et al., 2011). Asimismo, los resultados de otra investigación resaltaron que los virus del subtipo H1N2 aislados durante 2010

fueron producto de un rearreglo entre un subtipo H1N1 del linaje EA (del cual deriva su gen HA) y un virus H3N2 de origen porcino (de cual deriva su gen NA) (Moreno et al., 2012). Esta información es ampliada por medio del análisis de los aislamientos obtenidos en Italia desde 1998 hasta 2012 a partir de cerdos que mostraban signos compatibles con influenza, permitiendo la caracterización del subtipo H1N1 del linaje EA, el subtipo H1N1pdm09 y varios subtipos H1N2 (algunos llevaban el gen HA de virus estacionales humanos, otros del linaje EA y varios surgieron del rearreglo con la cepa H1N1pdm09) (Moreno et al., 2013). Las investigaciones más recientes en ese país lograron la detección y caracterización de diez virus de influenza del subtipo H1N1 entre los años 2012 y 2013, evidenciando la circulación simultánea inicial de virus H1N1pdm09 y cepas H1N1 del linaje EA, pero posteriormente se aislaron dos virus H1N1pdm09 y tres virus de un subtipo H1N1 que poseía el gen HA del virus pandémico y el resto de genes procedían del subtipo H1N1 del linaje EA (Chiapponi et al., 2014).

La situación en Francia durante 2011 y 2012 es descrita con los resultados obtenidos en un monitoreo de tres granjas de cerdos, ya que durante los brotes presentados en el transcurso del estudio se pudieron detectar molecularmente los subtipos H1N1 del linaje EA, el subtipo H1N2 de origen humano en cada una de las granjas estudiadas y se caracterizó un subtipo H1N2 producto del rearreglo entre los virus mencionados; sin embargo, no se confirmó la presencia del subtipo H1N1pdm09, ni el subtipo H3N2 (Rose et al., 2013). Por otro lado, en España se pudieron aislar doce cepas diferentes en una investigación desarrollada durante 2010, de las cuales, cinco correspondían al subtipo H1N1, cuatro al subtipo H3N2 y tres al subtipo H1N2. El análisis filogenético de la secuencia completa del genoma de estos virus determinó que los subtipos H1N1 correspondían a cepas H1N1pdm09, a virus del linaje EA y a cepas de influenza porcina endémicas de Europa. Las cepas del subtipo H3N2 pertenecían a los linajes de influenza porcina, mientras que los virus H1N2 se asociaban a virus de influenza de origen estacional humano (Martín-Valls et al., 2014). De otra parte, se han llegado a determinar nuevos cambios en los virus circulantes en el Reino Unido, debido a que durante 2010 se logró la caracterización completa del genoma de un virus H1N2 y se concluyó que fue originado del rearreglo entre el virus H1N1pdm09 (del cual derivaban los genes internos) y un subtipo H1N2 (del cual procedían los genes HA y NA) (Howard et al., 2011).

Los estudios serológicos también han brindado información acerca de la introducción de la cepa H1N1pdm09, este ha sido el caso de Luxemburgo, donde se tomaron muestras de sangre en 36 granjas en 2009 (antes de la pandemia) y en 2012 (después de la pandemia); obteniendo resultados que evidencian que inicialmente se demostró la reactividad a las cepas H1N1 del linaje EA y a virus de influenza porcina H1N2 y H3N2 de linajes endémicos contemporáneos, pero posteriormente, se comprobó la introducción de la cepa H1N1pdm09 en los cerdos de esta región debido a un aumento en la detección de anticuerpos neutralizantes contra este virus durante 2012 (Lutheke, Sausy, Black, Wildscutz y Muller, 2014). De otra parte, algunas investigaciones en Finlandia pudieron comprobar mediante análisis molecular la circulación de algunos virus del subtipo H1N1 del linaje EA y cepas H1N1pdm09 en muestras de cerdos tomadas en 2009 y 2010; sin embargo durante el periodo de 2011 y 2012 no se detectaron virus de influenza porcina de ningún subtipo (Nokireki, Laine, London, Ikonen y Huovilainen, 2013).

En cuanto a los cambios moleculares asociados a rearreglos, éstos se han podido establecer en Alemania, ya que durante 2009-2010 se realizó la caracterización de los virus detectados a partir de muestras de hisopados y tejidos pulmonares de cerdos, demostrando la presencia de un nuevo subtipo H1N1 que poseía el gen NA de una cepa del linaje EA y el resto de genes estaban asociados al virus H1N1pdm09. Adicionalmente, se caracterizaron otros virus de los subtipos H1N1 (incluyendo la cepa H1N1pdm09) y H1N2 que circularon durante ese mismo periodo (Starick et al., 2011). Tales variaciones son expuestas nuevamente en 2011, cuando se realizó una investigación epidemiológica a partir de 2078 muestras de hisopados nasales tomados de una población de cerdos; el análisis molecular de los virus detectados evidenció la presencia del virus H1N1pdm09 y también de virus del subtipo H1N2 que llevaban todos los genes de la cepa pandémica, exceptuando el gen NA. El estudio de filogenia del gen NA concluyó que estos virus se originaron del rearreglo con tres linajes diferentes: un linaje H1N2 detectado en Suecia, el linaje H3N2 de influenza porcina y los virus H3N2 de influenza estacional humana (Starick et al., 2012). La presencia de rearreglos en este país es reiterada nuevamente, por medio de los resultados obtenidos a partir de una investigación realizada en una población de cerdos de Alemania entre 2009 y 2012, en la cual, la caracterización filogenética y molecular de los aislamientos obtenidos comprobó

la presencia del subtipo H1N1pdm09, de un subtipo H1N2 (cuyo gen HA derivó de la cepa H1N1pdm09 y el gen NA de un subtipo H3N2 estacional humano) y de un virus H3N1 (que poseía los genes HA, M, NS y PB1 del virus H3N2 estacional humano, mientras que los genes NA, NP, PA y PB2 derivaron de la cepa H1N1pdm09) (J. Lange et al., 2013)

Es importante mencionar que el contexto global en este continente queda expuesto durante el desarrollo de una vigilancia epidemiológica del virus de influenza a partir de 9000 pjaras en diecisiete países de Europa (Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Polonia, entre otros) durante 2010 y 2013, pudiendo encontrar un porcentaje de detección de 53.6% para el subtipo H1N1 del linaje EA, 13% para el subtipo H1N2 de origen humano, 9.1% para la cepa H3N2 de origen humano y 10.3% para las cepas H1N1pdm09. De igual forma, se detectaron virus originados del rearreglo entre los diferentes linajes, especialmente entre cepas endémicas y pandémicas, que representaron el 13.9% de los aislamientos (Simon et al., 2014)

1.5.4 Asia

Los estudios iniciales realizados en China y Taiwán entre 2009 y 2010 reportaron la presencia del virus H1N1pdm09 dentro de la población de cerdos, ya que los análisis filogenéticos comprobaron la presencia de este subtipo sin evidencia de rearreglos con otras cepas (Lan et al., 2013; Zhao et al., 2012). Las plantas de beneficio han sido el lugar de múltiples estudios de monitoreo para los virus de influenza, como por ejemplo, durante 2009 y 2010, cuando se procesaron 1850 hisopados nasales mediante RT-PCR y se evidenció la presencia de diferentes cepas, que fueron descritas como virus del subtipo H1N1pdm09, H1N1 porcino clásico y H1N1 del linaje EA (Chen et al., 2013). Investigaciones similares llevadas a cabo durante este mismo periodo, demostraron que el análisis molecular de un total de 3600 hisopados nasales de cerdos, permitió la clasificación de 36 virus de los subtipos H1N1 y H1N2, que fueron caracterizados como virus de tipo H1N1pdm09 y un subtipo H1N2 del linaje EA que poseía el gen NA de un virus de influenza estacional. De igual forma, se pudieron reconocer a virus del subtipo H1N1 que poseían los genes NA y HA del linaje EA, en tanto que los genes internos procedían de la cepa H1N1pdm09 (Zhu et al., 2011). Otros resultados obtenidos durante

2010-2011 bajo condiciones similares describieron la detección molecular de un subtipo H3N2 de influenza porcina y la secuenciación de sus genoma y el subsiguiente análisis filogenético estableció que los genes HA y NA procedían de un virus H3N2 de influenza estacional humana de triple rearreglo, mientras que los genes internos derivaban de la cepa H1N1pdm09 (Fan et al., 2012). Durante 2011 se llevó a cabo una estrategia de monitoreo en cerdos al sacrificio, que permitió evidenciar la presencia de cepas del subtipo H1N1 y la caracterización molecular de 2 de los 6 virus detectados concluyó que pertenecían al linaje EA, que continúa siendo prevalente en esta región (Qi et al., 2012). En ese mismo contexto, el análisis molecular de muestras tomadas al sacrificio a partir de animales clínicamente sanos durante 2012 logró la detección de dos virus del subtipo H1N2; tales virus fueron secuenciados y se estableció que portaban el gen HA de virus del subtipo H1N1 del linaje EA, el gen NA se asoció a un virus del subtipo H1N2 del linaje norteamericano, pero los genes restantes derivaron de la cepa H1N1pdm09 (Qiao, Liu, Yang, Chen, Xu y Chen, 2014). De otra parte, en China se siguen evidenciando múltiples rearreglos a nivel de granja, como se evidenció en una investigación de un brote respiratorio durante 2010 que permitió el aislamiento y la caracterización de un virus del subtipo H1N1 de influenza porcina que poseía los genes NS y NP del linaje clásico de influenza porcina, los genes HA, NA, M, PA y PB2 del linaje EA y el gen PB1 de un virus de influenza estacional humana (Xu et al., 2011).

La primera detección del virus H1N1pdm09 en una granja de cerdos comerciales en Tailandia se reportó en 2009 (Sreta et al., 2010), y su presencia fue confirmada en el desarrollo de estudios adicionales (Takemae et al., 2011). La circulación de diversas cepas durante 2009 y 2011 se confirmó por medio de técnicas moleculares, al ser capaz de identificar veintitrés virus del subtipo H1N1 y siete más del tipo H3N2. La secuenciación completa del genoma y el análisis filogenético clasificó a estos virus en cuatro linajes principales: clásico porcino, EA, triple rearreglo e influenza estacional humana (Poonsuk, Sangthong, Petcharat y Lekcharoensuk, 2013). Posteriormente, se obtuvieron evidencias de rearreglos con la cepa H1N1pdm09, ya que el análisis de hisopados nasales tomados en cerdos con signología respiratoria permitió el estudio genético de virus aislados, y se reveló que todos sus genes estaban asociados al subtipo H1N1pdm09, excepto el gen NA que se relacionó con virus de influenza porcina endémicos (Kitikoon et al., 2011). Nuevas evidencias fueron sumadas a este hecho, ya

que durante 2011 se estableció la presencia de dos subtipos H3N2, cuyos genes HA y NA se relacionaban con cepas de influenza estacional humana, pero los demás segmentos virales se asociaban a la cepa H1N1pdm09. De igual forma, se caracterizaron seis subtipos H1N1 que fueron descritos en el linaje de la cepa H1N1pdm09 para cada uno de los genes (Hiromoto et al., 2012). Durante 2010 y 2012 se logró la caracterización de veintitrés virus de influenza y se concluyó que siete de estos se asociaban a la cepa H1N1pdm09, uno correspondía a un virus H1N1 que se caracterizó por contener los genes PB2, PB1, PA, HA, NP, M y NS de la cepa pandémica y el gen NA de virus endémicos de Tailandia y tres subtipos H1N1 fueron descritos como cepas endémicas de influenza porcina de esta región. Además, se caracterizaron otros virus originados de rearreglos, entre los cuales nueve correspondían al subtipo H3N2 (cuyos genes HA y NA se asociaban a virus endémicos porcinos y los demás segmentos procedían de la cepa H1N1pdm09), tres al subtipo H1N2 (los cuales llevaban los genes PB2, PB1, PA, HA, NP, M y NS del subtipo pandémico, mientras que su gen NA derivó de una cepa H3N2 estacional humana) (Charoenvisal et al., 2013). Este tipo de variaciones se evidenciaron desde 2011 hasta 2014 cuando se demostró la presencia de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 de linajes endémicos, así como virus pertenecientes a los mismos subtipos mencionados que surgieron del rearreglo entre las cepas endémicas y el subtipo H1N1pdm09 (Nonthabenjawan et al., 2014).

En India se realizó un estudio de prevalencia de anticuerpos contra el virus de influenza durante 2011, analizándose 925 muestras de suero de una población de cerdos mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación y se demostró una prevalencia del 37% de sueros positivos al virus H1N1pdm09, 29% al virus H3N2 estacional humano y 0.3% a la cepa H1N1 de influenza estacional humana (Sabale, Pawar, More y Mishra, 2013). En otro estudio realizado en 2009 durante distintos brotes reportados en granjas de cerdos de India, se analizaron muestras tomadas a partir de cerdos que mostraban signos clínicos compatibles con infección por virus de influenza, detectándose virus asociados a la cepa H1N1pdm09 en los genes HA, NA y M, mientras que los genes restantes se asociaban con el linaje norteamericano de influenza porcina (Nagarajan et al., 2010).

En Corea de sur se reportaron diversos brotes, en los que se caracterizó la cepa H1N1pdm09 y se demostró su circulación en la población de cerdos de esta región (Song et al., 2010). Otros hallazgos obtenidos durante 2010 permitieron la caracterización

molecular de virus del subtipo H1N2 con rearreglos, ya que el gen NA se asoció a virus de influenza endémicos, en tanto, el resto de genes derivaron de cepas H1N1pdm09 de diversas procedencias (Yeon et al., 2012). La existencia de rearreglos es demostrada durante 2011-2012, ya que a pesar que el análisis molecular de muestras tomadas en cerdos al sacrificio permitió establecer la presencia de virus H1N1pdm09 que no habían sufrido rearreglos, también se comprobó la circulación de subtipos H1N2 endémicos y se evaluaron virus del subtipo H3N2 y H3N1 que llevaban genes del linaje de triple rearreglo norteamericano y la cepa H1N1pdm09 (Pascua et al., 2013). Otro estudio realizado en plantas de beneficio durante 2013 comprobó la presencia de subtipo H1N2, y se determinó que el gen HA derivó de un virus H1N1 del linaje EA, el gen NA provino de cepas endémicas de Corea del Sur, y los genes restantes derivaron de un subtipo H3N2 que se había originado del rearreglo con el virus H1N1pdm09 (Lee et al., 2015)

1.5.5 África y Australia

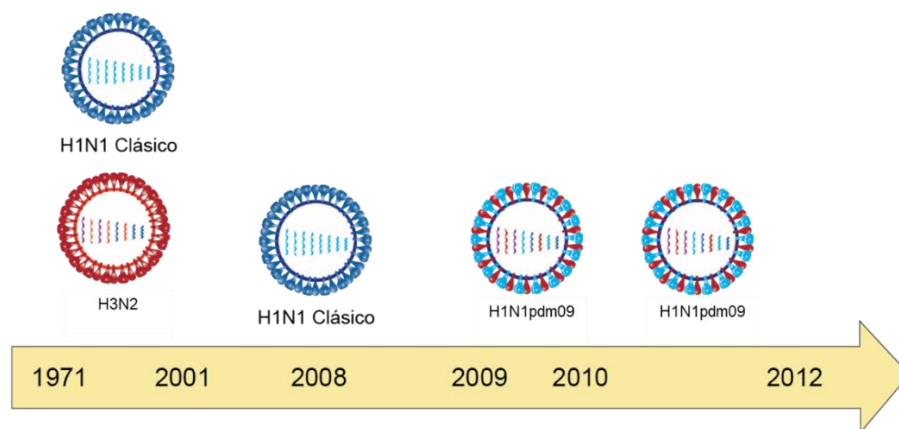
Los primeros reportes de la cepa H1N1pdm09 en África se realizaron a partir de muestras tomadas de once piaras localizadas en Camerún durante 2009 y 2010. De las 104 muestras de hisopados nasales analizadas, dos resultaron positivas, pudiéndose caracterizar como virus de tipo H1N1pdm09 mediante análisis moleculares y filogenéticos. De igual forma, se demostró la reactividad serológica a la cepa pandémica (Njabo et al., 2012). El desarrollo de estudios adicionales entre 2009 y 2012 ha comprobado la circulación y permanencia del virus H1N1pdm09 mediante ensayos de RT-PCR en Camerún y Nigeria (Larison et al., 2014; Meseko, Odaibo y Olaleye, 2014). Tales hallazgos son confirmados en la nación de Togo, mediante el análisis de 325 hisopados nasales tomados en plantas de beneficio durante 2012 y 2014, lo cual permitió la caracterización del virus H1N1pdm09 (Ducatez, Awoume y Webby, 2015). De otra parte, el aumento en los niveles de anticuerpos contra la cepa H1N1pdm09 en Nigeria y Camerún es evidenciada por medio del análisis de muestras de sueros tomadas en cerdos durante 2009 hasta 2012 (Snoeck et al., 2015).

La situación epidemiológica de la influenza porcina en Australia es analizada en la investigación de algunos brotes presentados en granjas comerciales de cerdos durante 2009. La evaluación molecular de los virus detectados mediante RT-PCR permitió

caracterizar a los aislamientos como virus de tipo H1N1pdm09 y la secuenciación completa del genoma evidenció que no habían sufrido rearrreglos con las cepas endémicas (Deng et al., 2012)

1.6 Situación en Colombia

En nuestro país existe evidencia de reactividad serológica contra virus de influenza en cerdos a los subtipos H1N1 y H3N2 desde finales de los 70's (Hanssen et al., 1977) y esta fue confirmada en otras investigaciones realizadas entre el periodo de 1991 y hasta el 2001 (Cucaita, 2005; Mogollon et al., 2003; Moscoso y Neira, 2001). Sin embargo, sólo hasta 2012, como resultado del análisis de 275 muestras de hisopados nasales, lavados bronquiales y tejido pulmonar colectadas durante los años 2008 a 2010 a partir de 778 granjas se publica por primera vez la detección molecular y el aislamiento de cepas de campo del virus de influenza porcina en Colombia. En este estudio se obtuvieron 15 aislamientos, de los cuales 12 estaban relacionados con el subtipo H1N1pdm09, mientras que los 3 restantes se asociaban al linaje clásico, correspondiendo éstos últimos a virus obtenidos de muestras colectadas durante el año 2008 (Ramírez-Nieto, 2012). Estudios adicionales de estos aislamientos, enfocados en el análisis de las características moleculares de los genes HA y NA de los virus mostraron un porcentaje de identidad del 99% entre los nueve aislamientos obtenidos del virus H1N1pdm09 y la cepa de referencia A/swine/California/04/2009. Como conclusión de estos estudios es de destacar que quedó en evidencia que la detección del subtipo H1N1 del linaje clásico fue posible durante 2008, pero después de esta fecha se comprueba un predominio de detección de cepas H1N1pdm09. En otro artículo publicado en 2013 se muestran los resultados obtenidos en un estudio de prevalencia en la región de los Llanos en Colombia, en donde se logró la detección de muestras positivas a influenza en la población de cerdos entre 2010 y 2012 (Figura 1-9). El análisis genómico permitió determinar, como se mencionó anteriormente, que los virus de influenza detectados correspondían al subtipo H1N1pdm09, ya que su porcentaje de identidad variaba entre 97% y 100% (Karlsson et al., 2013). Asimismo, es importante mencionar que hasta la fecha en Colombia no ha sido posible aislar o detectar virus del subtipo H3N2 en cerdos, a pesar de tener evidencia serológica de su circulación en el medio (Carmona, 2015).

Figura 1-9: Tipos de virus de influenza presentes en cerdos en Colombia⁹

Basados en lo expuesto anteriormente, sumado a los reportes presentados en diferentes partes del mundo que demuestran el efecto producido por la aparición de la cepa pandémica en la presentación de rearreglos de los virus de influenza que circulan actualmente en la población humana y en los cerdos, es evidente la necesidad de conocer la situación actual de la infección y de las características de los virus de influenza que circulan en el país con el fin de establecer estrategias de prevención y control basadas particularmente en estas condiciones.

⁹ Representación gráfica de las cepas de influenza porcina caracterizadas en Colombia, iniciando con la detección serológica de los virus H3N2 y H1N1 de tipo clásico, hasta la caracterización molecular de la cepa H1N1pdm09 desde 2009

Bibliografía

- Air, G. M. (2015). Influenza virus antigenicity and broadly neutralizing epitopes. *Current Opinion in Virology*, 11, 113–121. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.03.006>
- Ali, A., Khatri, M., Wang, L., Saif, Y. M., y Lee, C. W. (2012). Identification of swine H1N2/pandemic H1N1 reassortant influenza virus in pigs, United States. *Veterinary Microbiology*, 158(1–2), 60–68. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.014>
- Allerson, M. W., Davies, P. R., Gramer, M. R., y Torremorell, M. (2013). Infection Dynamics of Pandemic 2009 H1N1 Influenza Virus in a Two-Site Swine Herd. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61, 490–499. <http://doi.org/10.1111/tbed.12053>
- Alvarado-Facundo, E., Gao, Y., Ribas-Aparicio, R. M., Jiménez-Alberto, A., Weiss, C. D., y Wang, W. (2015). Influenza virus M2 protein ion channel activity helps to maintain pandemic 2009 H1N1 virus hemagglutinin fusion competence during transport to the cell surface. *Journal of Virology*, 89(4), 1975–85. <http://doi.org/10.1128/JVI.03253-14>
- Anastasina, M., Le May, N., Bugai, A., Fu, Y., Söderholm, S., Gaelings, L., y Kainov, D. E. (2016). Influenza virus NS1 protein binds cellular DNA to block transcription of antiviral genes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(11), 1440–1448. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.09.005>
- Anderson, T. K., Campbell, B. a, Nelson, M. I., Lewis, N. S., Janas-Martindale, A., Killian, M. L., y Vincent, A. L. (2015). Characterization of co-circulating swine influenza A viruses in North America and the identification of a novel H1 genetic clade with antigenic significance. *Virus Research*, 201, 24–31. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.009>
- Bahl, J., Vijaykrishna, D., Holmes, E. C., Smith, G. J. D., y Guan, Y. (2009). Gene flow and competitive exclusion of avian influenza A virus in natural reservoir hosts. *Virology*, 390(2), 289–297. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.002>
- Bálint, A., Metreveli, G., Widén, F., Zohari, S., Berg, M., Isaksson, M., y Kiss, I. (2009). The first Swedish H1N2 swine influenza virus isolate represents an uncommon reassortant. *Virology Journal*, 6, 180. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-6-180>
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3), 235–241.
- Bishop, J., Murmane, M., y Owen, R. (2009). Australia's Winter with the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *New England Journal of Medicine*, 361(27), 2591–2594.
- Bizebard, T., Gigant, B., Rigolet, P., Rasmussen, B., Diat, O., Băseckei, P., y Knossow, M. (1995). Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature*, 376(6535), 92–94. <http://doi.org/10.1038/376092a0>
- Brandenburg, B., Koudstaal, W., Goudsmit, J., Klaren, V., Tang, C., Bujny, M. V., y Friesen, R. H. E. (2013). Mechanisms of hemagglutinin targeted influenza virus neutralization. *PLoS ONE*, 8(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0080034>

- Brockwell-Staats, C., Webster, R. G., y Webby, R. J. (2009). Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 3(5), 207–213. <http://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00096.x>
- Brown, I. H. (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*, 74(1–2), 29–46. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00164-4](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00164-4)
- Brown, I. H., Harris, P. a., McCauley, J. W., y Alexander, D. J. (1998). Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *Journal of General Virology*, 79(1998), 2947–2955.
- Campitelli, L., Donatelli, I., Foni, E., Castrucci, M. R., Fabiani, C., Kawaoka, Y., y Webster, R. G. (1997). Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. *Virology*, 232(2), 310–318. <http://doi.org/10.1006/viro.1997.8514>
- Cao, B., Li, X.-W., Mao, Y., Wang, J., Lu, H.-Z., Chen, Y.-S., y Wang, C. (2009). Clinical features of the initial cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. *The New England Journal of Medicine*, 361(26), 2507–2517. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0906612>
- Capua, I. (2013). Joining the dots on the emergence of pandemic influenza. *Journal of Clinical Virology*, 58(2), 342–343. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.04.001>
- Carmona, L. C. G. (2015). Análisis de la variabilidad genética de 14 virus de influenza porcina circulantes en explotaciones comerciales de las regiones de mayor productividad en Colombia durante el periodo de 2008 a 2013. Universidad Nacional de Colombia.
- Carrat, F., y Flahault, A. (2007). Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine*, 25(39–40), 6852–6862. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
- Chambers, T. M., Hinshaw, V., Kawaoka, Y., Easterday, B. C., y Webster, R. G. (1991). Influenza viral infection of swine in the United States 1988-1989. *Archives of Virology*, 116, 261–265.
- Charoenvisal, N., Keawcharoen, J., Sreta, D., Chaiyawong, S., Nonthabenjawan, N., Tantawet, S., y Thanawongnuwech, R. (2013). Genetic characterization of Thai swine influenza viruses after the introduction of pandemic H1N1 2009. *Virus Genes*, 47(1), 75–85. <http://doi.org/10.1007/s11262-013-0927-x>
- Chen, Y., Zhang, J., Qiao, C., Yang, H., Zhang, Y., Xin, X., y Chen, H. (2013). Co-circulation of pandemic 2009 H1N1, classical swine H1N1 and avian-like swine H1N1 influenza viruses in pigs in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 13, 331–338. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.09.021>
- Chiapponi, C., Baioni, L., Luppi, A., Moreno, A., Castellan, A., y Foni, E. (2014). Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding. *Veterinary Microbiology*, 174(1–2), 9–15.

- <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.026>
- Ciacchi-Zanella, J. R., Schaefer, R., Gava, D., Haach, V., Cantão, M. E., y Coldebella, A. (2015). Influenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. *Veterinary Microbiology*, 180(1–2), 118–122. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.021>
- Colman, P. M. (1994). Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 3(10), 1687–96. <http://doi.org/10.1002/pro.5560031007>
- Crisci, E., Mussá, T., Fraile, L., y Montoya, M. (2013). Review: Influenza virus in pigs. *Molecular Immunology*, 55(3–4), 200–211. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.02.008>
- Cucaita, A. (2005). Estudio comparativo de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI) y la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos frente al virus de la influenza porcina. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Dangi, T., y Jain, A. (2012). Influenza Virus: A Brief Overview. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 82(1), 111–121. <http://doi.org/10.1007/s40011-011-0009-6>
- de Graaf, M., y Fouchier, R. A. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *Embo J*, 33(8), 823–841. <http://doi.org/10.1002/embj.201387442>
- Deng, Y. M., Iannello, P., Smith, I., Watson, J., Barr, I. G., Daniels, P., y Wong, F. Y. K. (2012). Transmission of influenza A(H1N1) 2009 pandemic viruses in Australian swine. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(3), e42–7. <http://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2012.00337.x>
- Ducatez, M. F., Awoume, F., y Webby, R. J. (2015). Influenza A(H1N1)pdm09 virus in pigs, Togo, 2013. *Veterinary Microbiology*, 177(1–2), 201–205. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.028>
- Ducatez, M. F., Hause, B., Stigger-Rosser, E., Darnell, D., Corzo, C., Juleen, K., y Webby, R. J. (2011). Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 17(9), 1624–1629. <http://doi.org/10.3201/1709.110338>
- Echavarría, M., Querci, M., Marcone, D., Videla, C., Martínez, A., Bonvehi, P., y Carballal, G. (2010). Pandemic (H1N1) 2009 cases, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 16(2), 311–313. <http://doi.org/10.3201/eid1602.091114>
- Elleman, C. J., y Barclay, W. S. (2004). The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology*, 321(1), 144–153. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2003.12.009>
- Essere, B., Yver, M., Gavazzi, C., Terrier, O., Isel, C., Fournier, E., y Moules, V. (2013). Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), E3840–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1308649110>

- Fan, X., Zhu, H., Zhou, B., Smith, D. K., Chen, X., Lam, T. T.-Y., y Guan, Y. (2012). Emergence and dissemination of a swine H3N2 reassortant influenza virus with 2009 pandemic H1N1 genes in pigs in China. *Journal of Virology*, 86(4), 2375–8. <http://doi.org/10.1128/JVI.06824-11>
- Fiers, W., Fang, R.-X., Min Jou, W., Huylebroeck, D., Verhoeyen, M., Devos, R., y Van Rompuy, L. (1981). Drift and Shift of Influenza Virus Studied At the Genomic Level. *Genetic Variation Among Influenza Viruses*, 17–27. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-515080-4.50007-9>
- Fleury, D., Barrère, B., Bizebard, T., Daniels, R. S., Skehel, J. J., y Knossow, M. (1999). A complex of influenza hemagglutinin with a neutralizing antibody that binds outside the virus receptor binding site. *Nature Structural Biology*, 6(6), 530–534. <http://doi.org/10.1038/9299>
- Fontana, J., y Steven, A. C. (2013). At low pH, influenza virus matrix protein M1 undergoes a conformational change prior to dissociating from the membrane. *Journal of Virology*, 87(10), 5621–8. <http://doi.org/10.1128/JVI.00276-13>
- Garten, R., Davis, C. T., Russell, C., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., y Cox, N. J. (2009). Antigenic and Genetic Characteristics of the Early Swine-origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science*, 325(5937), 197–201. <http://doi.org/10.1126/science.1176225>. Antigenic
- Gavazzi, C., Yver, M., Isel, C., Smyth, R. P., Rosa-Calatrava, M., Lina, B., y Marquet, R. (2013). A functional sequence-specific interaction between influenza A virus genomic RNA segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), 16604–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1314419110>
- Gerber, M., Isel, C., Moules, V., y Marquet, R. (2014). Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends in Microbiology*, 22(8), 446–455. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.001>
- Giese, M., Harder, T. C., Teifke, J. P., Klopffleisch, R., Breithaupt, A., Mettenleiter, T. C., y Vahlenkamp, T. W. (2008). Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 308–10. <http://doi.org/10.3201/eid1402.070864>
- Gjerset, B., Er, C., Lotvedt, S., Jorgensen, A., Hungnes, O., Lium, B., y Germundsson, A. (2011). Experiences after Twenty Months with Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Infection in the Naive Norwegian Pig Population. *Influenza Res Treat*, 2011, 206975. <http://doi.org/10.1155/2011/206975>
- Gray, G. C., Bender, J. B., Bridges, C. B., Daly, R. F., Krueger, W. S., Male, M. J., y Cox, N. J. (2012). Influenza A(H1N1)pdm09 virus among healthy show pigs, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 18(9), 1519–21. <http://doi.org/10.3201/eid1809.120431>
- Greenbaum, B. D., y Ghedin, E. (2015). Viral evolution: beyond drift and shift. *Current Opinion in Microbiology*, 26, 109–115. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.015>

- Gregory, V., Lim, W., Cameron, K., Bennett, M., Marozin, S., Klimov, A., y Lin, Y. P. (2001). Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs. *Journal of General Virology*, 82(September 1993), 1397–1406.
- Grøntvedt, C. A., Er, C., Gjerset, B., Germundsson, A., Framstad, T., Brun, E., y Lium, B. (2011). Clinical Impact of Infection with Pandemic Influenza (H1N1) 2009 Virus in Naïve Nucleus and Multiplier Pig Herds in Norway. *Influenza Res. Treat.*, 2011, 163745. <http://doi.org/10.1155/2011/163745>
- Grøntvedt, C. A., Er, C., Gjerset, B., Hauge, A. G., Brun, E., Jørgensen, A., y Framstad, T. (2013). Influenza A(H1N1)pdm09 virus infection in Norwegian swine herds 2009/10: the risk of human to swine transmission. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(3–4), 429–34. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.016>
- Groth, M., Lange, J., Kanrai, P., Pleschka, S., Scholtissek, C., Krumbholz, A., y Zell, R. (2014). The genome of an influenza virus from a pilot whale: relation to influenza viruses of gulls and marine mammals. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 24(November 1984), 183–6. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.026>
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J., y Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, 89(10), 2359–2376. <http://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004606-0>
- Hanssen, H., Hincapié, O., y López, J. (1977). Influenza en porcinos de Antioquia, Colombia. *Pan American Journal of Public Health*, 82(1).
- Harder, T. C., y Vahlenkamp, T. W. (2010). Influenza virus infections in dogs and cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(1–2), 54–60. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.009>
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Brecher, M., White, J. M., y Steven, A. C. (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19123–19127. <http://doi.org/10.1073/pnas.0607614103>
- Hasesebrouck, F., y Pensaert, M. (1988). Influenza in swine in Belgium (1969–1986) Epizootiologic aspects. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 11(3–4), 215–222. [http://doi.org/10.1016/0147-9571\(88\)90040-9](http://doi.org/10.1016/0147-9571(88)90040-9)
- He, S., Shi, J., Qi, X., Huang, G., Chen, H., y Lu, C. (2014). Lethal infection by a novel reassortant H5N1 avian influenza A virus in a zoo-housed tiger. *Microbes and Infection*, 17(October 2014), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.10.004>
- Hensley, S. E., Das, S. R., Bailey, A. L., Schmidt, L. M., Hickman, H. D., Jayaraman, A., y Yewdell, J. W. (2009). Hemagglutinin Receptor Binding Avidity Drives Influenza A Virus Antigenic Drift. *Science*, 326(5953), 734–736. <http://doi.org/10.1126/science.1178258>
- Hiromoto, Y., Parchariyanon, S., Ketusing, N., Netrabukkana, P., Hayashi, T., Kobayashi, T., y Saito, T. (2012). Isolation of the Pandemic (H1N1) 2009 virus and its

- reassortant with an H3N2 swine influenza virus from healthy weaning pigs in Thailand in 2011. *Virus Research*, 169(1), 175–181.
<http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.07.025>
- Hongjung, L., y Ning, L. (2013). *Radiology of Influenza A (H1N1)*. (L. Hongjun & L. Ning, Eds.). Springer. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-6162-9>
- Horimoto, T., y Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 591–600.
<http://doi.org/10.1038/nrmicro1208>
- Howard, W. A., Essen, S. C., Strugnell, B. W., Russell, C., Barrass, L., Reid, S. M., y Brown, I. H. (2011). Reassortant pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), 1049–1052.
<http://doi.org/10.3201/eid1706.101886>
- Howden, K. J., Brockhoff, E. J., Caya, F. D., McLeod, L. J., Lavoie, M., Ing, J. D., y Rohonczy, E. B. (2009). An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, 50(11), 1153–61. Retrieved from
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2764467&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hutchinson, E. C., y Fodor, E. (2013). Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses*, 5(10), 2424–2446. <http://doi.org/10.3390/v5102424>
- Ito, T., y Kawaoka, Y. (2000). Host-range barrier of influenza A viruses. *Veterinary Microbiology*, 74(2000), 71–75. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00167-X](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00167-X)
- Janke, B. H. (2013). Clinicopathological Features of Swine Influenza. In J. A. Richt & R. J. Webby (Eds.), *Swine Influenza: Current topics in microbiology and immunology* (pp. 69–83). Verlag: Springer. http://doi.org/10.1007/82_2013_308
- Jhung, M. a., Swerdlow, D., Olsen, S. J., Jernigan, D., Biggerstaff, M., Kamimoto, L., y Finelli, L. (2011). Epidemiology of 2009 pandemic influenza a (H1N1) in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 52(SUPPL. 1), 13–26.
<http://doi.org/10.1093/cid/ciq008>
- Jones, J. C., Koçer, Z. A., y Webster, R. G. (2013). Emergence of Influenza Viruses and Crossing the Species Barrier. *Microbiology Spectrum*, 1(2), 1–16.
<http://doi.org/10.1128/microbiolspec.OH-0010-2012>
- Jung, K., y Chae, C. (2004). Phylogenetic analysis of an H1N2 influenza A virus isolated from a pig in Korea. *Brief Report. Arch. Virol.*, 149(0304–8608 (Print)), 1415–1422.
<http://doi.org/10.1007/s00705-004-0324-9>
- Kappor, S., y Dhama, K. (2014). Clinical features of Influenza Viruses. In *Insight into Influenza Viruses of Animals and Humans* (pp. 103–110). Switzerland: Springer.
<http://doi.org/10.1007/978-3-319-05512-1>
- Karasin, A. I., Carman, S., Christopher, W., y Olsen, C. W. (2006). Identification of human H1N2 and influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005).

- Journal of Clinical Microbiology, 44(3), 1123–1126.
<http://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1123>
- Karasin, A. I., Landgraf, J., Swenson, S., Erickson, G., Goyal, S., Woodruff, M., y Olsen, C. W. (2002). Genetic Characterization of H1N2 Influenza A Viruses Isolated from Pigs throughout the United States. *Genetic Characterization of H1N2 Influenza A Viruses Isolated from Pigs throughout the United States. Society*, 40(3), 1073–1079.
<http://doi.org/10.1128/JCM.40.3.1073>
- Karlsson, E. a, Ciuoderis, K., Freiden, P. J., Seufzer, B., Jones, J. C., Johnson, J., y Schultz-Cherry, S. (2013). Prevalence and characterization of influenza viruses in diverse species in Los Llanos, Colombia. *Emerging Microbes & Infections*, 2(4), e20.
<http://doi.org/10.1038/emi.2013.20>
- Khan, K., Arino, J., Hu, W., Raposo, P., Sears, J., Calderon, F., y Gardam, M. (2009). Spread of a Novel Influenza A (H1N1) Virus via Global Airline Transportation. *New England Journal of Medicine*, 361(3), 212–214.
- Kitikoon, P., Sreta, D., Na Ayudhya, S. N., Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., Prakairungnamthip, D., y Amonsin, A. (2011). Brief report: Molecular characterization of a novel reassorted pandemic H1N1 2009 in Thai pigs. *Virus Genes*, 43(1), 1–5.
<http://doi.org/10.1007/s11262-011-0597-5>
- Kitikoon, P., Vincent, A. L., Gauger, P. C., Schlink, S. N., Bayles, D. O., Gramer, M. R., y Klimov, A. (2012). Pathogenicity and Transmission in Pigs of the Novel A(H3N2)v Influenza Virus Isolated from Humans and Characterization of Swine H3N2 Viruses Isolated in 2010-2011. *Journal of Virology*, 86(12), 6804–6814.
<http://doi.org/10.1128/JVI.00197-12>
- Klenk, H. D. (2014). Influenza Viruses En Route from Birds to Man. *Cell Host & Microbe*, 15(6), 653–654. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.019>
- Kong, W., Wang, F., Dong, B., Ou, C., Meng, D., Liu, J., y Fan, Z.-C. (2015). Novel reassortant influenza viruses between pandemic (H1N1) 2009 and other influenza viruses pose a risk to public health. *Microbial Pathogenesis*, 89, 62–72.
<http://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.002>
- Kothalawala, H., Toussaint, M. J. M., y Gruys, E. (2006). An overview of swine influenza. *The Veterinary Quarterly*, 28(2), 46–53.
<http://doi.org/10.1080/01652176.2006.9695207>
- Krug, R. M. (2015). Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Current Opinion in Virology*, 12, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.007>
- Kupradinum, S., Peanpijit, P., Bhodhikosoom, C., Yoshioka, Y., Endo, A., y Nerome, K. (1991). The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Archives of Virology*, 118, 289–297.
- Lan, Y.-C., Su, M.-C., Chen, C.-H., Huang, S.-H., Chen, W.-L., Tien, N., y Lin, C.-W. (2013). Epidemiology of pandemic influenza A/H1N1 virus during 2009-2010 in Taiwan. *Virus Research*, 177(1), 46–54. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.007>
- Lange, E., Kalthoff, D., Blohm, U., Teifke, J. P., Breithaupt, A., Maresch, C., y

- Vahlenkamp, T. W. (2009). Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *Journal of General Virology*, 90(Pt 9), 2119–2123. <http://doi.org/10.1099/vir.0.014480-0>
- Lange, J., Groth, M., Schlegel, M., Krumbholz, A., Wiczorek, K., Ulrich, R., y Dürrwald, R. (2013). Reassortants of the pandemic (H1N1) 2009 virus and establishment of a novel porcine H1N2 influenza virus, lineage in Germany. *Veterinary Microbiology*, 167(3–4), 345–56. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.024>
- Larison, B., Njabo, K. Y., Chasar, A., Fuller, T., Harrigan, R. J., y Smith, T. B. (2014). Spillover of pH1N1 to swine in Cameroon: an investigation of risk factors. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 55. <http://doi.org/10.1186/1746-6148-10-55>
- Laursen, N. S., y Wilson, I. a. (2013). Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses. *Antiviral Research*, 98(3), 476–483. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.021>
- Laver, W. G., Gerhard, W., Webster, R. G., Frankel, M. E., y Air, G. M. (1979). Antigenic drift in type A influenza virus : Peptide mapping and antigenic analysis of A / PR / 8 / 34 (HONI) variants selected with monoclonal antibodies. *Immunology*, 76(3), 1425–1429.
- Lee, J. H., Pascua, P. N. Q., Decano, A. G., Kim, S. M., Park, S.-J., Kwon, H.-I., y Choi, Y. K. (2015). Evaluation of the zoonotic potential of a novel reassortant H1N2 swine influenza virus with gene constellation derived from multiple viral sources. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 378–393. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.06.005>
- Liu, Q., Ma, J., Liu, H., Qi, W., Anderson, J., Henry, S. C., y Ma, W. (2012). Emergence of novel reassortant H3N2 swine influenza viruses with the 2009 pandemic H1N1 genes in the United States. *Archives of Virology*, 157(3), 555–562. <http://doi.org/10.1007/s00705-011-1203-9>
- Loeffen, W. L. a, Hunneman, W. a., Quak, J., Verheijden, J. H. M., y Stegeman, J. a. (2009). Population dynamics of swine influenza virus in farrow-to-finish and specialised finishing herds in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 137(1–2), 45–50. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.004>
- López-Robles, G., Montalvo-Corral, M., Burgara-Estrella, A., y Hernández, J. (2014). Serological and molecular prevalence of swine influenza virus on farms in northwestern Mexico. *Veterinary Microbiology*, 172(1–2), 323–328. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.017>
- Lorusso, A., Vincent, A. L., Gramer, M., Lager, K. M., y Ciacchi-zanella, J. R. (2013). Contemporary Epidemiology of North American Lineage Triple Reassortant Influenza A Viruses in Pigs. In J. a Richt y R. J. Webby (Eds.), *Current Topics in Microbiology and immunology-Swine Influenza* (pp. 113–131). Heidelberg: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-36871-4>
- Lutheke, N., Sausy, A., Black, A., Wildscutz, F., y Muller, C. (2014). Neutralizing antibodies against influenza A in pigs before and after the 2009 pandemic, Luxembourg. *Veterinary Microbiology*, 169, 96–101.

- <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.009>
- Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Parvin, J. D., y Palese, P. (1989). Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell*, 59(6), 1107–1113. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90766-6](http://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90766-6)
- Ma, W., Kahn, R. E., y Richt, J. a. (2008). The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *Journal of Molecular and Genetic Medicine : An International Journal of Biomedical Research*, 3(1), 158–166.
- Ma, W., Lager, K. M., Lekcharoensuk, P., Ulery, E. S., Janke, B. H., Solórzano, A., y Richt, J. a. (2010). Viral reassortment and transmission after co-infection of pigs with classical H1N1 and triple-reassortant H3N2 swine influenza viruses. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 9), 2314–21. <http://doi.org/10.1099/vir.0.021402-0>
- Ma, W., Lager, K. M., Vincent, A. L., Janke, B. H., Gramer, M. R., y Richt, J. A. (2009). The Role of Swine in the Generation of Novel Influenza Viruses, 56, 326–337. <http://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01217.x>
- Martín-Valls, G. E., Simon-Grifé, M., van Boheemen, S., de Graaf, M., Bestebroer, T. M., Busquets, N., y Mateu, E. (2014). Phylogeny of Spanish swine influenza viruses isolated from respiratory disease outbreaks and evolution of swine influenza virus within an endemically infected farm. *Veterinary Microbiology*, 170, 266–277. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.031>
- Medina, R. A., y García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 590–603. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2613>
- Mehle, A., Dugan, V. G., Taubenberger, J. K., y Doudna, J. A. (2012). Reassortment and Mutation of the Avian Influenza Virus Polymerase PA Subunit Overcome Species Barriers. *Journal of Virology*, 86(3), 1750–1757. <http://doi.org/10.1128/JVI.06203-11>
- Meseko, C. A., Odaibo, G. N., y Olaleye, D. O. (2014). Detection and isolation of 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus in commercial piggery, Lagos Nigeria. *Vet.Microbiol.*, 168(1873–2542 (Electronic)), 197–201. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.003>
- Metreveli, G., Emmoth, E., Zohari, S., Bálint, A., Widén, F., Muradrasoli, S., y Kiss, I. (2011). Comparison of two H1N2 swine influenza A viruses from disease outbreaks in pigs in Sweden during 2009 and 2010. *Virus Genes*, 42(2), 236–44. <http://doi.org/10.1007/s11262-011-0571-2>
- Mintern, J. D., Guillonneau, C., Turner, S. J., y Doherty, P. C. (2008). The immune response to influenza A viruses. In R. Rappuoli & G. Del Giudice (Eds.), *Influenza Vaccines for the Future* (pp. 113–138). Basel: Birkhäuser Basel. http://doi.org/10.1007/978-3-7643-8371-8_6
- Mitnaul, L. J., Matrosovich, M. N., Castrucci, M. R., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V, Kobasa, D., y Kawaoka, Y. (2000). Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol*, 74(13), 6015–6020. <http://doi.org/10.1128/JVI.74.13.6015-6020.2000>

- Mogollon, J., Rincón, M., Preciado, P., Cepeda, M., y S., R. (2003). Reactividad serológica frente al virus de la influenza porcina en explotaciones intensivas de Colombia. *Referencias Para Consultorios MV (Bogotá)*, (6), 15–20.
- Moisset, P.-A., Pederson, J., y Landry, N. (2015). Vaccine analysis: Strategies, principles, and control. In B. Nunnally, V. Turula, & R. Sitrin (Eds.), *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control* (pp. 1–665). Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-662-45024-6>
- Moreno, A., Chiapponi, C., Boniotti, M. B., Sozzi, E., Foni, E., Barbieri, I., y Cordioli, P. (2012). Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. *Veterinary Microbiology*, 156(3–4), 265–276. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.004>
- Moreno, A., Di Trani, L., Alborali, L., Vaccari, G., Barbieri, I., Falcone, E., y Cordioli, P. (2010). First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. *The Open Virology Journal*, 4, 52–6. <http://doi.org/10.2174/1874357901004010052>
- Moreno, A., Di Trani, L., Faccini, S., Vaccari, G., Nigrelli, D., Boniotti, M. B., y Cordioli, P. (2011). Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. *Veterinary Microbiology*, 149(3–4), 472–477. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.011>
- Moreno, A., Gabanelli, E., Sozzi, E., Lelli, D., Chiapponi, C., Ciccozzi, M., y Cordioli, P. (2013). Different evolutionary trends of swine H1N2 influenza viruses in Italy compared to European viruses. *Veterinary Research*, 44, 112. <http://doi.org/10.1186/1297-9716-44-112>
- Moscoso, C., y Neira, G. (2001). Prevalencia de reactores al virus de influenza porcina H3N2 en granjas de explotación intensiva en el país. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Munoz, O., De Nardi, M., Van Der Meulen, K., Van Reeth, K., Koopmans, M., Harris, K., y Capua, I. (2016). Genetic adaptation of influenza A viruses in domestic animals and their potential role in interspecies transmission: A literature review. *EcoHealth*, 13(1), 171–198. <http://doi.org/10.1007/s10393-014-1004-1>
- Munster, V. J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., y Fouchier, R. A. M. (2007). Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLoS Pathogens*, 3(5), e61. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030061>
- Murphy, B. R., Kasel, J. A., y Chanock, R. M. (1972). Association of Serum Anti-Neuraminidase Antibody with Resistance to Influenza in Man. *New England Journal of Medicine*, 286(25), 1329–1332. <http://doi.org/10.1056/NEJM197206222862502>
- Nagarajan, K., Saikumar, G., Arya, R. S., Gupta, A., Somvanshi, R., y Pattnaik, B. (2010). Influenza A H1N1 virus in Indian pigs & its genetic relatedness with pandemic human influenza A 2009 H1N1. *Indian J Med Res*, 132(August), 160–167.
- Nelson, M., Culhane, M. R., Rovira, A., y Norambuena, J. (2015). Novel Human-like Influenza A Viruses Circulate in Swine in Mexico and Chile. *PLOS Current*

- Outbreaks, 1(Aug 13), 1–10.
<http://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.c8b3207c9bad98474eca3013fa933ca6>. Authors
- Nelson, M. I., Gramer, M. R., Vincent, A. L., y Holmes, E. C. (2012). Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *Journal of General Virology*, 93(Pt_10), 2195–2203. <http://doi.org/10.1099/vir.0.044974-0>
- Nelson, M. I., Schaefer, R., Gava, D., Cantão, M. E., y Ciacchi-zanella, J. R. (2015). Influenza A Viruses of Human Origin in Swine , Brazil, 21(8), 1339–1348.
- Nelson, M. I., y Vincent, A. L. (2015). Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human–animal interface. *Trends in Microbiology*, 23(3), 142–153. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.002>
- Nelson, M. I., Wentworth, D. E., Culhane, M. R., Vincent, A. L., Viboud, C., LaPointe, M. P., y Detmer, S. E. (2014). Introductions and Evolution of Human-Origin Seasonal Influenza A Viruses in Multinational Swine Populations. *Journal of Virology*, 88(17), 10110–10119. <http://doi.org/10.1128/JVI.01080-14>
- Neumann, G., y Kawaoka, Y. (2015). Transmission of influenza A viruses. *Virology*, 479–480C, 234–246. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.009>
- Neumann, G., Noda, T., y Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459(7249), 931–939.
<http://doi.org/10.1038/nature08157>
- Nfon, C. K., Berhane, Y., Hisanaga, T., Zhang, S., Handel, K., Kehler, H., y Pasick, J. (2011). Characterization of H1N1 Swine Influenza Viruses Circulating in Canadian Pigs in 2009. *Journal of Virology*, 85(17), 8667–8679.
<http://doi.org/10.1128/JVI.00801-11>
- Nicoll, A., y Coulombier, D. (2009). Europe's initial experience with pandemic (H1N1) 2009 - mitigation and delaying policies and practices. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 14(29), 1–6. Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=19643049%5Cnpapers3://publication/uuid/5C0DE9AC-BFFD-4893-B34C-DD8FEECB3A80
- Njabo, K. Y., Fuller, T. L., Chasar, A., Pollinger, J. P., Cattoli, G., Terregino, C., y Smith, T. B. (2012). Pandemic A/H1N1/2009 influenza virus in Swine, Cameroon, 2010. *Veterinary Microbiology*, 156(1), 189–192.
<http://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31824d256f>. Pediatric
- Nokireki, T., Laine, T., London, L., Ikonen, N., y Huovilainen, A. (2013). The first detection of influenza in the Finnish pig population: a retrospective study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 69. <http://doi.org/10.1186/1751-0147-55-69>
- Nonthabenjawan, N., Chanvatik, S., Chaiyawong, S., Jairak, W., Boonyapisusopha, S., Tuanudom, R., y Amonsin, A. (2014). Genetic diversity of swine influenza viruses in Thai swine farms, 2011–2014. *Virus Genes*, 50(2), 221–230.

<http://doi.org/10.1007/s11262-014-1153-x>

- O'Neill, R. E., Talon, J., y Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal*, 17(1), 288–96. <http://doi.org/10.1093/emboj/17.1.288>
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E., y Fouchier, R. A. M. (2006). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, 312(5772), 384–388. <http://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Olsen, C. W. (2002). The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Research*, 85(2), 199–210. [http://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00027-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00027-8)
- Parrish, C. R., Murcia, P. R., y Holmes, E. C. (2015). Influenza Virus Reservoirs and Intermediate Hosts: Dogs, Horses, and New Possibilities for Influenza Virus Exposure of Humans: FIG 1. *Journal of Virology*, 89(6), 2990–2994. <http://doi.org/10.1128/JVI.03146-14>
- Pascua, P. N. Q., Lim, G. J., Kwon, H. Il, Park, S. J., Kim, E. H., Song, M. S., y Choi, Y. K. (2013). Emergence of H3N2pM-like and novel reassortant H3N1 swine viruses possessing segments derived from the A (H1N1)pdm09 influenza virus, Korea. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7, 1283–1291. <http://doi.org/10.1111/irv.12154>
- Pascua, P. N. Q., Song, M.-S., Lee, J. H., Choi, H.-W., Han, J. H., Kim, J.-H., y Choi, Y.-K. (2008). Seroprevalence and genetic evolutions of swine influenza viruses under vaccination pressure in Korean swine herds. *Virus Research*, 138(1–2), 43–49. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.08.005>
- Peng, L., Chen, C., Kai-yi, H., Feng-xia, Z., Yan-li, Z., Zong-shuai, L., y Zhi-jing, X. (2015). Molecular characterization of H9N2 influenza virus isolated from mink and its pathogenesis in mink. *Veterinary Microbiology*, 176(1–2), 88–96. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.009>
- Pensaert, M., Ottis, K., Vandeputte, J., Kaplan, M. M., y Bachmann, P. a. (1981). Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bulletin of the World Health Organization*, 59(1), 75–78.
- Pereda, A., Rimondi, A., Cappuccio, J., Sanguinetti, R., Angel, M., Ye, J., y Perez, D. R. (2011). Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: Are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 5(6), 409–412. <http://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00246.x>
- Pérez, L. J., Perera, C. L., Coronado, L., Rios, L., Vega, A., Frías, M. T., y Díaz de Arce, H. (2015). Molecular epidemiology study of swine influenza virus revealing a reassorted virus H1N1 in swine farms in Cuba. *Preventive Veterinary Medicine*, 119(3–4), 172–178. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.013>
- Perez, L. J., Perera, C. L., Vega, A., Frias, M. T., Rouseaux, D., Ganges, L., y de Arce, H.

- D. (2013). Isolation and complete genomic characterization of pandemic H1N1/2009 influenza viruses from Cuban swine herds. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 781–788. <http://doi.org/DOI 10.1016/j.rvsc.2012.11.018>
- Pohl, M. O., Lanz, C., y Stertz, S. (2016). Late stages of the influenza A virus replication cycle???A tight interplay between virus and host. *Journal of General Virology*, 97(9), 2058–2072. <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000562>
- Pomorska-Mól, M., Kwit, K., Markowska-Daniel, I., Kowalski, C., y Pejsak, Z. (2014). Local and systemic immune response in pigs during subclinical and clinical swine influenza infection. *Research in Veterinary Science*, 97(2), 412–421. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.06.007>
- Poonsuk, S., Sangthong, P., Petcharat, N., y Lekcharoensuk, P. (2013). Genesis and genetic constellations of swine influenza viruses in Thailand. *Veterinary Microbiology*, 167(3–4), 314–326. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.007>
- Qi, X., Pan, Y., Qin, Y., Zu, R., Tang, F., Zhou, M., y Song, Y. (2012). Molecular characterization of avian-like H1N1 swine influenza A viruses isolated in Eastern China, 2011. *Virologica Sinica*, 27(5), 292–8. <http://doi.org/10.1007/s12250-012-3262-9>
- Qiao, C., Liu, L., Yang, H., Chen, Y., Xu, H., y Chen, H. (2014). Novel triple reassortant H1N2 influenza viruses bearing six internal genes of the pandemic 2009/H1N1 influenza virus were detected in pigs in China. *Journal of Clinical Virology*, 61(4), 529–534. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.10.014>
- Qu, Y., Zhang, R., Cui, P., Song, G., Duan, Z., y Lei, F. (2011). Evolutionary genomics of the pandemic 2009 H1N1 influenza viruses (pH1N1v). *Virology Journal*, 8(1), 250. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-250>
- Ramirez-Nieto, G. C. (2012). First isolation and identification of H1N1 swine influenza viruses in Colombian pig farms. *Health*, 4(10), 983–990. <http://doi.org/10.4236/health.2012.430150>
- Rey-Benito, G. J., Castro-Jiménez, M. A., y Castillo-Pabón, J. O. (2009). Análisis descriptivo de las primeras muertes por influenza pandémica (H1N1) 2009 en Colombia. *Infectio*, 13(4), 254–258.
- Richard, M., de Graaf, M., y Herfst, S. (2014). Avian influenza A viruses: from zoonosis to pandemic. *Future Virology*, 9(5), 513–524. <http://doi.org/10.2217/fvl.14.30>
- Riquelme, R., Riquelme, M., Rioseco, M. L., Inzunza, C., Gomez, Y., Contreras, C., y Ramirez, J. (2010). Characteristics of hospitalised patients with 2009 H1N1 influenza in Chile. *Eur Respir J*, 36(4), 864–9. <http://doi.org/10.1183/09031936.00180409>
- Rivero, M. D., y Carbonetti, A. (2016). La “gripe española” en perspectiva médica: los brotes de 1918-1919 en la escena científica argentina. *Ciencias de La Salud*, 14(2), 281–293. <http://doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.11>
- Rodriguez-Frandsen, A., Alfonso, R., y Nieto, A. (2015). Influenza virus polymerase: Functions on host range, inhibition of cellular response to infection and pathogenicity. *Virus Research*, 209, 1–16.

<http://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.017>

- Rose, N., Hervé, S., Eveno, E., Barbier, N., Eono, F., Dorenlor, V., y Simon, G. (2013). Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *Veterinary Research*, 44, 72. <http://doi.org/10.1186/1297-9716-44-72>
- Runstadler, J., Hill, N., Hussein, I. T. M., Puryear, W., y Keogh, M. (2013). Connecting the study of wild influenza with the potential for pandemic disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 162–187. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.020>
- Sabale, S. S., Pawar, S. D., More, B. K., y Mishra, A. C. (2013). Seroprevalence of pandemic influenza H1N1 (2009) & seasonal influenza viruses in pigs in Maharashtra & Gujarat States, India, 2011. *Indian J Med Res*, 138(August), 267–269. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24056606>
- Safo, M. K., Musayev, F. N., Mosier, P. D., Zhou, Q., Xie, H., y Desai, U. R. (2014). Crystal structures of influenza a virus matrix protein M1: Variations on a theme. *PLoS ONE*, 9(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0109510>
- Sandbulte, M., Spickler, A., Zaabel, P., y Roth, J. (2015). Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines*, 3(1), 22–73. <http://doi.org/10.3390/vaccines3010022>
- Schaefer, R., Rech, R. R., Gava, D., Cantão, M. E., da Silva, M. C., Silveira, S., y Zanella, J. R. C. (2015). A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. *Archives of Virology*, 160(1), 29–38. <http://doi.org/10.1007/s00705-014-2223-z>
- Schaefer, R., Zanella, J. R. C., Brentano, L., Vincent, A. L., Ritterbusch, G. a., Silveira, S., y Mores, N. (2011). Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(9), 761–767. <http://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000900007>
- Scholtissek, C. (1994). Source for Influenza Pandemics. *European Journal of Epidemiology*, 10(4), 456–458.
- Shaw, M. L., y Palese, P. (2013). Orthomyxoviridae. In D. Knipe & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 1151–1185). Philadelphia, USA, USA: Wolter Kuwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Shortridge, K. F. (1992). Pandemic Influenza: A Zoonosis? *Seminars in Respiratory Infectious*, 7(1), 11–25.
- Shortridge, K. F., y Webster, R. G. (1979). Geographical Distribution of Swine (Hsw1N1) and Hong Kong (H3N2) Influenza Virus Variants in Pigs in Southeast Asia. *Intervirology*, 11(1), 9–15.
- Shortridge, K., Webster, R., Butterfield, W., y Campbell, C. (1977). Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. *Science*, 196(4297), 1454–1455. <http://doi.org/10.1126/science.867041>

- Simon, G., Larsen, L. E., Dürrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., y Loeffen, W. (2014). European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PloS One*, 9(12), e115815. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0115815>
- Skehel, J. J., y Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza haemagglutinin. *Annual Reviews in Biochemistry*, 69, 531–569.
- Smith, D. J. (2004). Mapping the Antigenic and Genetic. *Science*, 305(July), 371–376. <http://doi.org/10.1126/science.1097211>
- Smith, G. J. D., Bahl, J., Vijaykrishna, D., Zhang, J., Poon, L. L. M., Chen, H., y Guan, Y. (2009). Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28), 11709–12. <http://doi.org/10.1073/pnas.0904991106>
- Smith, G. J. D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., y Rambaut, A. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459(7250), 1122–1125. <http://doi.org/10.1038/nature08182>
- Snoeck, C., Abiola, O., Sausy, A., Okwen, M., Olubayo, A., Owoade, A., y Muller, C. (2015). Serological evidence of pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, West and Central Africa. *Veterinary Microbiology*, 176(1–2), 165–171. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.12.022>
- Solbak, S. M. Ø., Sharma, A., Bruns, K., Röder, R., Mitzner, D., Hahn, F., y Fossen, T. (2013). Influenza A virus protein PB1-F2 from different strains shows distinct structural signatures. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1834(2), 568–582. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.11.009>
- Song, M., Lee, J. H., Pascua, P. N. Q., Baek, Y. H., Kwon, H., Park, K. J., y Choi, Y. (2010). Evidence of Human-to-Swine Transmission of the Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus in South Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3204–3211. <http://doi.org/10.1128/JCM.00053-10>
- Sreta, D., Tantawet, S., Ayudhya, S. N. N., Thontiravong, A., Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., y Kitikoon, P. (2010). Pandemic (H1N1) 2009 Virus on Commercial Swine Farm, Thailand. *Emerging Infectious Diseases*, 16(10), 1587–1591. <http://doi.org/10.3201/eid1610.100665>
- Starick, E., Lange, E., Fereidouni, S., Bunzenthall, C., Höveler, R., Kuczka, A., y Harder, T. (2011). Reassorted pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus discovered from pigs in Germany. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 5), 1184–8. <http://doi.org/10.1099/vir.0.028662-0>
- Starick, E., Lange, E., Grund, C., Grosse Beilage, E., Döhring, S., Maas, A., y Harder, T. C. (2012). Reassortants of pandemic influenza A virus H1N1/2009 and endemic porcine HxN2 viruses emerge in swine populations in Germany. *The Journal of General Virology*, 93(Pt 8), 1658–63. <http://doi.org/10.1099/vir.0.042648-0>

- Steel, J., y Lowen, A. (2014). Influenza A Virus Reassortment. In R. W. Compans y M. Oldstone (Eds.), *Current Topics in Microbiology and Immunology Influenza Pathogenesis and Control -Volume I* (Volume 385, pp. 377–393). Heidelberg: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-11155-1>
- Sugimura, T., Yonemochi, H., Ogawa, T., Tanaka, Y., y Kumagai, T. (1980). Isolation of a Recombinant Influenza Virus (Hsw 1 N2) from Swine in Japan. *Archives of Virology*, 66, 271–274.
- Suzuki, T., Horiike, G., Yamazaki, Y., Kawabe, K., Masuda, H., Miyamoto, D., y Suzuki, Y. (1997). Swine influenza virus strains recognize sialylsugar chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *FEBS Letters*, 404(2–3), 192–196. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00127-0](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00127-0)
- Takemae, N., Parchariyanon, S., Ruttanapumma, R., Hiromoto, Y., Hayashi, T., Uchida, Y., y Saito, T. (2011). Swine influenza virus infection in different age groups of pigs in farrow-to-finish farms in Thailand. *Virology Journal*, 8(1), 537. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-537>
- Tarus, B., Chevalier, C., Richard, C.-A., Delmas, B., Di Primo, C., y Slama-Schwok, A. (2012). Molecular dynamics studies of the nucleoprotein of influenza A virus: role of the protein flexibility in RNA binding. *PLoS One*, 7(1), e30038. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030038>
- Taubenberger, J. K. (1997). Initial Genetic Characterization of the 1918 “Spanish” Influenza Virus. *Science*, 275(5307), 1793–1796. <http://doi.org/10.1126/science.275.5307.1793>
- Taubenberger, J. K., y Kash, J. C. (2010). Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell Host & Microbe*, 7(6), 440–451. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
- Taubenberger, J. K., y Morens, D. M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annual Review of Pathology*, 3, 499–522. <http://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>
- Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D. A. A., Chen, L.-M., y Donis, R. O. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), 4269–4274. <http://doi.org/10.1073/pnas.1116200109>
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., y Donis, R. O. (2013). New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003657. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003657>
- Tremblay, D., Allard, V., Doyon, J.-F., Bellehumeur, C., Spearman, G., Harel, J., y Gagnon, C. (2011). Emergence of a new swine H3N2 and pandemic (H1N1) 2009 Influenza A virus reassortant in two Canadian animal populations, mink and swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4386–4390. <http://doi.org/10.1007/s11548-012-0737-y>

- Trifonov, V., Khiabani, H., Greenbaum, B., y Rabadan, R. (2009). The origin of the recent swine influenza A(H1N1) virus infecting humans. *Euro Surveillance*, 14(17), 19193. <http://doi.org/19193> [pii]
- Van Reeth, K. (2007). Avian and swine influenza viruses: Our current understanding of the zoonotic risk. *Veterinary Research*, 38(2), 243–260. <http://doi.org/10.1051/vetres:2006062>
- Vasin, A. V., Temkina, O. A., Egorov, V. V., Klotchenko, S. A., Plotnikova, M. A., y Kiselev, O. I. (2014). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research*, 185, 53–63. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>
- Vijaykrishna, D., Mukerji, R., y Smith, G. J. D. (2015). RNA Virus Reassortment: An Evolutionary Mechanism for Host Jumps and Immune Evasion. *PLOS Pathogens*, 11(7), e1004902. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004902>
- Vijaykrishna, D., Smith, G. J. D., Pybus, O. G., Zhu, H., Bhatt, S., Poon, L. L. M., y Peiris, J. S. M. (2011). Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. *Nature*, 473(7348), 519–522. <http://doi.org/10.1038/nature10004>
- Vincent, A. L., Lager, K. M., y Anderson, T. K. (2014). A Brief Introduction to Influenza A Virus in Swine. In E. Spackman (Ed.), *Animal Influenza Virus* (pp. 243–258). New York: Springer Science. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_20
- Wang, C., Takeuchi, K., Pinto, L. H., y Lamb, R. a. (1993). Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *Journal of Virology*, 67(9), 5585–5594.
- Wang, J.-Y., Chen, Z.-L., Li, C.-S., Cao, X., Wang, R., Tang, C., y Liu, H.-J. (2015). The distribution of sialic acid receptors of avian influenza virus in the reproductive tract of laying hens. *Molecular and Cellular Probes*, 29(2), 129–134. <http://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.01.002>
- Wang, T. T., y Palese, P. (2009). Forum Unraveling the Mystery of Swine Influenza Virus. *Cell*, 137(6), 983–985. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.032>
- Warren, A., Bell, M., y Budd, L. (2010). Airports, localities and disease: Representations of global travel during the H1N1 pandemic. *Health and Place*, 16(4), 727–735. <http://doi.org/10.1016/j.healthplace.2010.03.004>
- Watanabe, A. S. A., Carraro, E., Moreira, L., Camargo, C., Sinohara, J., Puerari, D., y Bellei, N. (2011). Respiratory virus infections among hospitalized patients with suspected influenza A H1N1 2009 virus during the first pandemic wave in Brazil. *Braz J Infect Dis*, 15(3), 220–224.
- Webby, R. J., Swenson, S. L., Krauss, S. L., Gerrish, P. J., Goyal, S. M., y Webster, R. G. (2000). Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *Journal of Virology*, 74(18), 8243–8251. <http://doi.org/10.1128/JVI.74.18.8243-8251.2000>
- Webster, R. G. (1998). Influenza: An emerging disease. *Emerging Infectious Diseases*, 4(3), 436–441. <http://doi.org/10.3201/eid0403.980325>

- Webster, R. G., Bean, W., Gorman, O., Chambers, T., y Kawaoka, Y. (1992). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *American Society for Microbiology*, 56(1), 152–179. [http://doi.org/0146-0749/92/010152-28\\$02.00/0](http://doi.org/0146-0749/92/010152-28$02.00/0)
- Webster, R. G., Webby, R. J., y Perdue, M. (2011). Influenza Vaccines for the Future, 77–93. <http://doi.org/10.1007/978-3-0346-0279-2>
- Weingartl, H. M., Berhane, Y., Hisanaga, T., Neufeld, J., Kehler, H., Emburay-Hyatt, C., y Pasick, J. (2010). Genetic and pathobiologic characterization of pandemic H1N1 2009 influenza viruses from a naturally infected swine herd. *Journal of Virology*, 84(5), 2245–2256. <http://doi.org/10.1128/JVI.02118-09>
- World Health Organization. (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*, 58(4), 585–591.
- World Health Organization. (2009). New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009 (Vol. 84). Switzerland.
- Wu, J. T., Ma, E. S. K., Lee, C. K., Chu, D. K. W., Ho, P.-L., Shen, A. L., y Malik Peiris, J. S. (2010). The infection attack rate and severity of 2009 pandemic influenza (H1N1) in Hong Kong. *Clinical Infectious Diseases*, 51(10), 1184–1191. <http://doi.org/10.1086/656740>
- Xu, M., Huang, Y., Chen, J., Huang, Z., Zhang, J., Zhu, Y., y Xiang, H. (2011). Isolation and genetic analysis of a novel triple-reassortant H1N1 influenza virus from a pig in China. *Veterinary Microbiology*, 147(3–4), 403–9. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.012>
- Yeon, J., Park, S. J., Kim, H. K., Rho, S., Nguyen, G. Van, Song, D., y Park, B. K. (2012). Identification of Reassortant Pandemic H1N1 Influenza Virus in Korean Pigs Samples for Virus Isolation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), 699–707.
- Yoon, S.-W., Webby, R., y Webster, R. G. (2014). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. In R. W. Compans & M. Oldstone (Eds.), *Current Topics in Microbiology and immunology Influenza Pathogenesis and Control-Volume I* (Volume 385, pp. 359–370). Switzerland: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-1115-1>
- Yu, H., Hua, R.-H., Zhang, Q., Liu, T.-Q., Liu, H.-L., Li, G.-X., y Tong, G.-Z. (2008). Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1067–1075. <http://doi.org/10.1128/JCM.01257-07>
- Zeldovich, K. B., Liu, P., Renzette, N., Foll, M., Pham, S. T., Venev, S. V., y Finberg, R. W. (2015). Positive Selection Drives Preferred Segment Combinations during Influenza Virus Reassortment. *Molecular Biology and Evolution*, 32(6), 1519–1532. <http://doi.org/10.1093/molbev/msv044>
- Zell, R., Bergmann, S., Krumbholz, A., Wutzler, P., y Dürwald, R. (2008). Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant. *Archives of Virology*,

- 153(11), 2085–92. <http://doi.org/10.1007/s00705-008-0244-1>
- Zell, R., Scholtissek, C., y Ludwig, S. (2013). Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. In J. Richt & R. Webby (Eds.), *Current Topics en Microbiology and Immunology Swine Influenza* (Volume 370, pp. 30–48). Heidelberg: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-36871-4>
- Zhang, X.-S., De Angelis, D., White, P. J., Charlett, A., Pebody, R. G., y McCauley, J. (2013). Co-circulation of influenza A virus strains and emergence of pandemic via reassortment: the role of cross-immunity. *Epidemics*, 5(1), 20–33. <http://doi.org/10.1016/j.epidem.2012.10.003>
- Zhang, X., Friedl, M. A., y Schaaf, C. B. (2006). Avian Influenza. *Journal of Geophysical Research* (Vol. 111). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Zhao, G., Fan, Q., Zhong, L., Li, Y., Liu, W., Liu, X., y Liu, X. (2012). Isolation and phylogenetic analysis of pandemic H1N1/09 influenza virus from swine in Jiangsu province of China. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 125–32. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.06.009>
- Zhou, N. N., Senne, D. a, Landgraf, J. S., Swenson, S. L., Erickson, G., Rossow, K., y Webster, R. G. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *Journal of Virology*, 73(10), 8851–6. <http://doi.org/10.1128/JCM.01549-07>
- Zhu, H., Webby, R., Lam, T., Smith, D., Peiris, J., y Guan, Y. (2013). History of Swine Influenza Viruses in Asia. In J. A. Richt & R. Webby (Eds.), *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Volume 370, pp. 57–65). Manhattan, Kansas: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-36871-4>
- Zhu, H., Zhou, B., Fan, X., Lam, T. T. Y., Wang, J., Chen, a., y Guan, Y. (2011). Novel Reassortment of Eurasian Avian-Like and Pandemic/2009 Influenza Viruses in Swine: Infectious Potential for Humans. *Journal of Virology*, 85(20), 10432–10439. <http://doi.org/10.1128/JVI.05352-11>
- Zhu, W., Yang, S., Dong, L., Yang, L., Tang, J., Zou, X., y Shu, Y. (2015). The repeated introduction of the H3N2 virus from human to swine during 1979–1993 in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 20–24. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.001>
- Zimmer, S. M., y Burke, D. S. (2009). Historical Perspective — Emergence of Influenza A (H1N1) Viruses. *New England Journal of Medicine*, 361(3), 279–285. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0904322>

2. Monitoreo del virus de influenza A en cerdos en plantas de beneficio de Colombia

2.1 Resumen

La influenza se manifiesta como una enfermedad de tipo respiratorio en cerdos y es causada por un virus del género *influenzavirus* A, perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, y cuyos reportes iniciales están estrechamente relacionados a la pandemia de la gripe española de 1918. La enfermedad se caracteriza por presentar una baja mortalidad y una alta morbilidad, representada por una rápida propagación entre los cerdos e impactando la tasa de crecimiento de los animales en los sistemas productivos. Teniendo en cuenta los aspectos relacionados a una alta variabilidad genética de los virus de influenza, y especialmente el rápido surgimiento y diseminación de la cepa H1N1 pandémica de 2009 (H1N1pdm09) se llevó a cabo un estudio para evaluar la situación actual de la presencia del virus en la población porcina en Colombia. Como una estrategia para tener una mayor cobertura que brindara una aproximación a la situación del país, se recolectaron 369 muestras de tejido pulmonar de cerdos clínicamente sanos en plantas de beneficio ubicadas en 11 regiones geográficas de Colombia, las cuales fueron analizadas mediante pruebas de qRT-PCR para la detección de virus de influenza A. De acuerdo con los resultados obtenidos para este primer análisis, las muestras positivas a la prueba molecular fueron utilizadas para realizar intentos de aislamiento del virus, utilizando para ello huevos de embrión de pollo SPF de nueve a diez días de incubación. Para la evaluación del líquido alantoideo se emplearon ensayos de hemaglutinación y RT-PCR para la comprobar la presencia de virus de influenza A en los huevos de embrión de pollo inoculados. Como resultado de este estudio se encontró que las pruebas de detección molecular permitieron evidenciar la circulación del virus de influenza A en cinco de las 11 regiones geográficas analizadas, confirmando su presencia en las regiones de mayor producción de cerdos en Colombia (Antioquia,

Cundinamarca y Valle). De igual manera, el análisis de los aislamientos virales permitió la recuperación y confirmación exitosa de cinco cepas de campo de virus de influenza en cerdos, cuatro de ellas procedentes de Antioquia y una de Cundinamarca. Estos resultados demostraron que las plantas de beneficio constituyen una alternativa viable para el estudio y caracterización de los virus de influenza, permitiendo una cobertura a nivel nacional para la recolección de muestras de cerdos de diferentes procedencias. En este sentido, también se pudo comprobar que la estrategia utilizada y el tipo de muestras recolectadas fueron útiles no solo para el diagnóstico molecular, sino que también permitieron el aislamiento de cepas de campo del virus de influenza en porcinos, brindando herramientas valiosas para la detección temprana de cambios moleculares que permitan anticipar el surgimiento de cepas con potencial pandémico y/o epidémico en el territorio nacional. De igual forma, fue posible identificar aquellas regiones geográficas donde existe continúa circulando de este virus y en las cuales es posible enfocar el desarrollo de nuevas investigaciones, bien sea extendiendo el monitoreo hacia los sistemas de producción porcina o analizando la presencia de este agente en otras especies de interés.

Palabras clave: Cepa H1N1pdm09, Colombia, detección molecular, huevos de embrión de pollo SPF, plantas de beneficio, virus de influenza A en cerdos

2.2 Abstract

Influenza may be displayed as a respiratory disease in pigs, this is caused by an *influenzavirus* type A, which is a member of the *Orthomyxoviridae* family and whose initial reports are closely related to the 1918 Spanish flu pandemic. The course of the disease is characterized by a low mortality and a high morbidity, caused by a rapid dissemination among pigs and reducing growth rate, which is ultimately translated into negative indexes in production systems. Taking into consideration the genetic aspects of high variability rate associated to influenza viruses, and specially the rapid emergence and spread of 2009 pandemic H1N1 influenza virus (H1N1pdm09), we carried out a survey to assess the presence of the virus in the Colombian swine population. In order to do so, we collected 369 lung tissue samples from clinically normal slaughterhouse pigs from 11 geographic regions of Colombia, which were analyzed using qRT-PCR test for the

detection of influenza A virus. Based on these results, positive samples were processed to perform isolation trials in 9-to10-day-old specific pathogen free chicken embryo eggs. Inoculated eggs were tested by hemagglutination test and RT-PCR assay directed to influenza A virus matrix gene. Molecular detection techniques established circulation of swine influenza viruses in five out of 11 geographic regions monitored, confirming their presence in major pig producing areas in Colombia (Antioquia, Cundinamarca and Valle). Likewise, sample testing through viral isolation analysis enabled successful recovery and confirmation of five viral strains, four of them from Antioquia and the other one from Cundinamarca. Our results demonstrate that slaughterhouses represent a feasible alternative for research and characterization of influenza virus, providing a nationwide coverage for the collection of pig samples from different regions. In this sense, we were also able to demonstrate that the strategy and conditions employed and the type of samples collected were useful not only for the molecular detection but also for viral isolation of swine influenza virus. It shows that this procedure can be considered as a useful tool to accomplish early detection of molecular changes to anticipate the appearance of strains with pandemic and/or epidemic potential throughout the national territory. Similarly, it was possible to identify the geographic regions where the virus continues to circulate, and those ones that could be chosen to perform future investigations, either by extending surveillance towards porcine raising facilities or by exploring other species of interest.

Keywords: Colombia, H1N1pdm09 strain, molecular detection, slaughterhouses, SPF chicken embryo eggs, swine influenza A virus

2.3 Introducción

La presentación de enfermedades respiratorias es uno de los principales desafíos para la industria porcina a nivel mundial, representado pérdidas considerables asociadas con la mortalidad de cerdos en diferentes etapas productivas (Alvarez et al., 2015). La manifestación de los signos clínicos respiratorios es determinada por múltiples factores como las condiciones medioambientales, situaciones de manejo y la presencia de agentes infecciosos que interactúan y hacen parte del complejo respiratorio porcino (CRP). Entre los agentes más comunes en este complejo se encuentran

microorganismos bacterianos como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, además de los virus causantes del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), la enfermedad de Aujeszky, el coronavirus respiratorio porcino, el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) y el virus de la influenza porcina (Hansen et al., 2010; Mancipe et al., 2014). Esta última enfermedad desempeña un papel primario dentro del CRP, caracterizándose por una baja mortalidad y una alta morbilidad asociada a su rápida propagación entre los cerdos, siendo las principales vías de transmisión los aerosoles, fómites contaminados y el contacto directo con secreciones provenientes de individuos enfermos (Neira et al., 2016). Los signos iniciales que se desarrollan en los animales afectados son una fiebre de 40,5°C, letargia, anorexia y se pueden observar descargas nasales y oculares (Kappor y Dhama, 2014). Otros signos característicos son una dificultad para respirar y tos, esta última causada por una bronquitis y bronquiolitis extensa. La recuperación de los cerdos es rápida y generalmente toma entre 6 y 7 días después de la infección (Janke, 2013; Taubenberger y Morens, 2008). Todos los grupos etarios pueden verse comprometidos, pero se ha demostrado una mayor incidencia en cerdos jóvenes, especialmente aquellos en etapa de precebo (Kothalawala et al., 2006; Torremorell et al., 2012)

Los primeros reportes de esta enfermedad están estrechamente relacionados con la pandemia de la gripe española de 1918 y es causada por un virus del género *influenza A virus*, que a su vez pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Se caracteriza por ser un virus envuelto de 80-120 nm de diámetro y poseer un genoma ARN segmentado de cadena sencilla de polaridad negativa. El genoma se compone de ocho segmentos virales que codifican entre 11 o 12 proteínas (Harris et al., 2006; Shaw y Palese, 2013), entre las cuales se encuentran las proteínas de superficie, Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) que se proyectan a través de la envoltura viral y se encargan de interactuar con los receptores de ácido siálico de las células huésped (Fanning et al., 2000; Mair et al., 2014). El gen de la proteína de matriz codifica para dos proteínas, M1 (proteína de matriz) y M2 (proteína de poro de iones)(Ito et al., 1991). Las proteínas PB1 (polimerasa básica 1), PB2 (polimerasa básica 2), PA (polimerasa ácida) conforman el complejo de la ARN polimerasa. Con respecto a éstas, recientemente se han caracterizado nuevas proteínas accesorias PB1-F2, PB1-N40 y PA-X codificadas sólo por

algunos virus de influenza (Rodriguez-Frandsen et al., 2015; Solbak et al., 2013; Vasin et al., 2014).

Una característica importante de los virus de influenza es su alta tasa de variabilidad genética, la cual está determinada principalmente por dos mecanismos; el primero, denominado *drift* antigénico, se relaciona con la actividad de la ARN polimerasa, la cual no posee un sistema de corrección de lectura eficiente durante el ciclo de replicación, lo que conlleva a la aparición de mutaciones graduales en uno o más segmentos genómicos (Air, 2015; Greenbaum y Ghedin, 2015). El segundo, conocido como shift (o rearreglo), involucra el intercambio de uno o más segmentos virales cuando ocurre una infección simultánea con dos cepas diferentes del virus de influenza en una misma célula (Greenbaum et al., 2015). Tales cambios trabajan de forma cooperativa para la generación de virus con nuevas características moleculares y adaptaciones que les permitan cruzar la barrera entre especies y en ciertas ocasiones adquirir un potencial pandémico (Mehle et al., 2012; Smith et al., 2009), resultando en una mayor complejidad para el entendimiento biológico y epidemiológico de este agente, dificultando así el establecimiento de medidas de control y/o prevención eficientes en las poblaciones tanto de animales como humanas.

Esta complejidad se asocia igualmente a la existencia de múltiples subtipos de virus de influenza A, ya que, de acuerdo a las características moleculares y antigénicas de las glicoproteínas de superficie, HA y NA, estos virus se han clasificado en 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA que se reconocen actualmente en aves y diversos huéspedes mamíferos (Dangi y Jain, 2012; Olsen et al., 2006; Webster, 1998; Wu et al., 2014), siendo los más comunes y prevalentes dentro de la especie porcina son los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 (Yoon et al., 2014); sin embargo, los cerdos también son susceptibles a infecciones por virus de influenza de origen humano y aviar, y a menudo son denominados “vasos mezcladores” para la generación de nuevos virus, debido a la capacidad de expresar en la superficie de sus células epiteliales los receptores de ácido siálico en conformación α -2,6 y α -2,3 (Scholtissek, 1994; Suzuki et al., 1997); el primero está relacionado con la afinidad por los virus de origen humano (Neumann y Kawaoka, 2015), mientras que el segundo media preferiblemente la entrada de los virus de influenza de origen aviar (Wang et al., 2015). A pesar de lo anterior, es importante

mentonar que recientemente se ha considerado que la vía de transmisión de humanos hacia cerdos es una fuente potencial para la generación de nuevas variantes del virus (Nelson et al., 2012; Zhu et al., 2015) y es en este contexto que la aparición del virus H1N1 pandémico de 2009 (H1N1pdm09) y los eventos ocurridos después de la pandemia han llevado a un incremento en la diversidad genética de los linajes de virus de influenza en los cerdos (Kong et al., 2015; Vijaykrishna et al., 2010).

Con respecto a la situación de la infección por virus de influenza en cerdos en Colombia, existe evidencia de reactividad serológica desde finales de los 70's y detección molecular, así como aislamiento de cepas de campo por parte de nuestro grupo de investigación a partir de 2008, lo cual demuestra la circulación del virus de influenza en la población de cerdos en nuestro país, identificándose la presencia de cepas del tipo H1N1 clásico y H3N2 porcino, al igual que el virus H1N1pdm09, sugiriéndose una predominancia de este último en las principales regiones productoras de cerdos del país en la actualidad (Cucaita, 2005; Hanssen et al., 1977; Mogollon et al., 2003; Ramirez-Nieto, 2012). Basados en lo anterior y teniendo en cuenta que se desconocen los efectos ocurridos como consecuencia de la aparición del virus H1N1pdm09 en las poblaciones de cerdos en Colombia, se hace necesario llevar a cabo estudios de vigilancia que permitan además de realizar la detección y caracterización molecular de los virus que circulan actualmente, obtener cepas de campo que amplíen las posibilidades de conocer características biológicas, antigénicas y de patogenicidad del virus de influenza en Colombia, aportando al conocimiento de un agente cuyo amplio rango de huéspedes y características intrínsecas asociadas a la variabilidad de su genoma representan un riesgo y un desafío permanente para la ciencia y la salud a nivel mundial.

Con el fin de contribuir a éste conocimiento se planteó el presente estudio, el cual busca establecer una estrategia que permita acceder a un número importante de muestras con alcance a nivel nacional, lo cual beneficiará estudios de tipo epidemiológico, disminuyendo riesgos desde el punto de vista de bioseguridad en las granjas al permitir la utilización de muestras a nivel de planta de beneficio sin tener que ingresar directamente a las explotaciones, y evitando factores de estrés en los animales relacionados con la manipulación indispensable para obtención de muestras en animales vivos, lo cual contribuye en reducir factores que puedan impactar el bienestar animal. Se

propone igualmente la implementación de metodologías para detección y análisis molecular así como su evaluación para la obtención de cepas de campo a partir de estas muestras, lo cual permitirá determinar no solo la presencia y circulación del virus de influenza A en cerdos en el país, sino que además ofrecerá una alternativa para generar un banco de cepas de campo de fundamental relevancia para el entendimiento de la evolución de los virus de influenza en nuestro medio, lo cual guarda relevancia no solo a nivel nacional sino también internacional.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Recolección y preparación de muestras

Se obtuvieron muestras del tracto respiratorio, particularmente de tejido pulmonar, de cerdos al sacrificio en condiciones *postmortem*. Las muestras fueron tomadas de cerdos clínicamente sanos en 22 plantas de beneficio localizadas en 11 regiones geográficas de Colombia, entre septiembre y diciembre de 2015. El diseño del estudio es de tipo exploratorio y el tamaño de la muestra fue de 306 de acuerdo con el censo porcino realizado durante 2014 (Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), 2014), utilizando una población de cerdos de 3.928.585 (N) en las once regiones geográficas de interés (Tabla 2-1), con una prevalencia esperada del 15% (p) de acuerdo con estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, una significancia del 95% (Z), una precisión del 2%, y el valor de q = 85% (1-15%); de acuerdo con lo anterior, se calculó el tamaño de la muestra de la siguiente manera:

$$\frac{NZ^2pq}{d^2(N-1)+Z^2pq} n = \frac{3.928.585 (1.96)^2(0.15)(0.85)}{(0.02)^2(3.928.585-1)+1.96^2(0.15)(0.85)} n = 306$$

El total de muestras se incrementó considerando un margen de error del 14% por pérdidas asociadas a la recolección, transporte y/o procesamiento, para un total de 369, que fueron tomadas en forma aleatoria y seleccionado entre 2-5 cerdos procedentes de la misma granja a partir de la línea de sacrificio. La distribución de las muestras en cada una de las regiones se realizó de acuerdo con la disponibilidad y el número de cerdos en las respectivas plantas de beneficio.

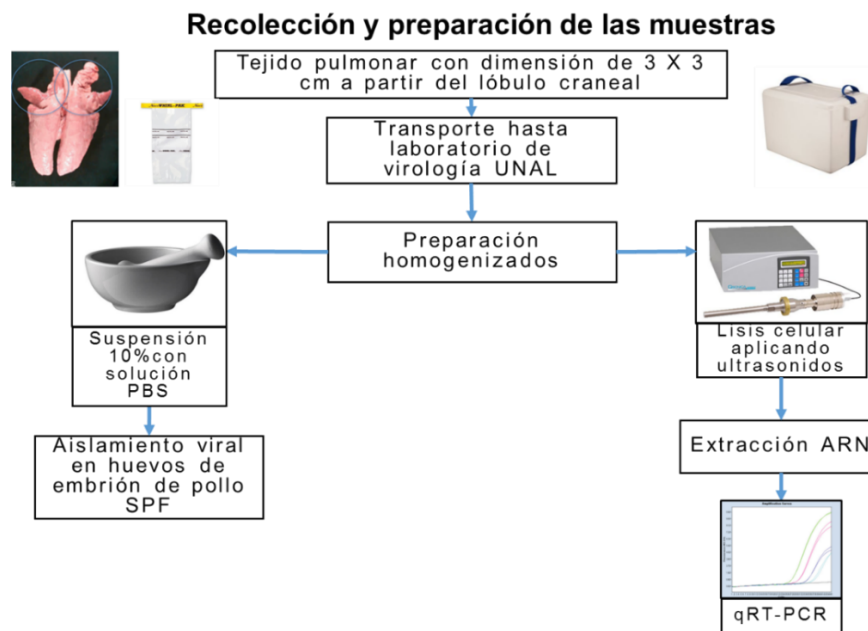
Tabla 2-1: Proporción de muestras de acuerdo con el censo porcino de 2014

Regiones	Número de cerdos	Número de muestras recolectadas
Cundinamarca (y Bogotá)	458.958	80
Eje Cafetero	403.012	20
Antioquia	1.536.647	125
Valle del Cauca	533.862	54
Meta	418.161	10
Tolima	108.054	10
Chocó	44.677	10
Huila	79.258	10
Santander	93.430	10
Atlántico	89.007	20
Nariño	163.519	20
Total	3.928.585	369

La toma de muestras se realizó de manera aséptica a partir de un fragmento con un tamaño de 3 cm de largo por 3 cm de ancho a partir del lóbulo craneal de los pulmones, el cual fue depositado en bolsas Nasco® individuales y transportado bajo condiciones de refrigeración hasta el laboratorio de virología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. En el laboratorio, se tomó una porción de cada tejido para preparar una suspensión al 10% con PBS (búfer fosfato salino, pH: 7.1±0.1) suplementado al 3% con solución de antibiótico-antimicótico (Gibco®, penicilina, estreptomicina y anfotericina B; Referencia 15240096), en un volumen de 2 mL y se fraccionó en dos volúmenes que se almacenaron a una temperatura de -70°C hasta el momento de ser utilizadas en los intentos de aislamiento viral. Para la extracción del ARN se preparó una suspensión adicionando 90 mg de cada muestra a 600 µL de PBS y realizando la lisis del tejido por ultrasonido con 50 khz durante 30 segundos, empleando un equipo sonicador (Cole-Parmer®, Ultrasonic Homogenizer 4710 Series). Posterior a esto, se fraccionó el homogenizado en tres volúmenes de 200 µL que se almacenaron a -70°C hasta el momento de llevar a cabo la extracción del ARN empleando para ello el RNAeasy Mini Kit (Qiagen®, CA, USA). Las contra-muestras de cada homogenizado y los tejidos pulmonares originales se conservaron a una temperatura de -70°C para llevar a cabo

análisis adicionales cuando se requirió. Las actividades desarrolladas se describen en la figura 2-1.

Figura 2-1: Diagrama de actividades para la obtención y preparación de las muestras de tejido pulmonar en cerdos¹⁰



2.4.2 Análisis mediante RT-PCR tiempo real (qRT-PCR)

A partir del RNA obtenido como se indicó previamente, se llevó a cabo un qRT-PCR inicial empleando sondas de hidrólisis TaqMan® y primers para la detección del gen de la matriz (M) de los virus de influenza A (Inf A), del gen NP de virus de influenza porcina (SW Inf A) y del gen HA del virus de influenza del subtipo H1 (SW H1), mediante la adaptación de un protocolo estandarizado por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) en Atlanta, USA (CDC, 2009). De acuerdo con los resultados obtenidos, se llevó a cabo una subtipificación por medio de un ensayo de qRT-PCR multiplex usando sondas de hidrólisis TaqMan® para la detección de los genes HA y NA de los virus de

¹⁰ Diagrama para el desarrollo de actividades en la preparación de las muestras, iniciando con la recolección hasta la reparación de los homogenizados para los ensayos de RT-PCR y aislamiento viral

H3N2 porcino; este ensayo fue adaptado a partir de un procedimiento operativo estándar suministrado por la Universidad de Minnesota (MOL.SOP.218). Se realizaron reacciones en un solo paso utilizando el sistema de RT-PCR *SuperScript™ III Platinum® One-step* (Invitrogen®, California, USA). Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se realizaron empleando el termociclador LightCycler 480 (Roche Life Science®) y la recuperación y análisis de datos se llevó a cabo usando el programa Roche LightCycler® versión 1.5. Las muestras fueron consideradas negativas cuando mostraban un valor de Cp mayor a 39 y positivas si se obtenían valores por debajo de este límite.

Para las reacciones en el primer análisis se usó un volumen final de 25 µL, teniendo en cuenta los siguientes volúmenes y concentraciones de trabajo: 1.25X para el búfer 2X *Reaction Mix* Invitrogen® (Invitrogen, Corp., CA, USA), 1 µM para cada primer, 0.25 µM de cada sonda, 0.5 µL de la enzima *Taq SuperScript III RT/Platinum®* (Invitrogen, Corp., CA, USA) y 5 µL del ácido nucleico extraído de cada muestra. Los perfiles térmicos iniciaron con la transcripción inversa en un ciclo a 50°C por 30 minutos, luego un ciclo de activación de la enzima *Taq* a 95°C por 2 minutos y luego 45 ciclos de amplificación por PCR a 95°C por 15 segundos y a 55°C por 30 segundos, en el cual se captaban las señales de fluorescencia. Las muestras positivas en el análisis de Inf A y negativas para los ensayos de SW Inf A y SW H1, fueron incluidas en la prueba de subtipificación para detectar a virus del subtipo H3N2 porcino, empleando un volumen final de reacción de 25 µL y las siguientes concentraciones y volúmenes de trabajo: 1.25X para el búfer 2X *Reaction Mix* Invitrogen® (Invitrogen, Corp., CA, USA), 0.5 µM del primer forward H3, 0.75 µM del primer reverse H3, 0.75 µM del primer forward N2, 1 µM del primer reverse N2, 0.3 µM de cada sonda, 0.5 µL de la enzima *Taq SuperScript III RT/Platinum®* (Invitrogen, Corp., CA, USA) y 5 µL del ácido nucleico extraído de cada muestra. Los ciclos térmicos de este ensayo comenzaron con la transcripción inversa a 50°C por 30 minutos, luego un ciclo activación de la *Taq* polimerasa a 95°C por 15 minutos y luego 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 segundos), hibridación (58°C por 1 minuto), elongación (72°C por 1 minuto), y finalmente otro ciclo de elongación a 72°C por 7 minutos. Las secuencias de primers y sondas utilizadas se encuentran consignadas en la tabla 2-2.

Tabla 2-2: Primers y sondas usados para la detección y caracterización de virus de influenza A mediante qRT-PCR

Primers y sondas	Secuencia (5'>3')
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA
Sonda InfA ¹¹	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC
Sonda SW InfA ¹²	CYA CTG CAA GCC CA" T" ACA CAC AAG CAG GCA
SW H1 Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA
SW H1 Reverse	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGG
Sonda SW H1 ¹¹	CA GAA TAT ACA "T"CC RGT CAC AAT TGG ARA A
H3 Forward	CGC AAT MGC AGG TTT CAT AGA
H3 Reverse	GAT GCC TGA AAC CGT ACC A
Sonda H3 ¹³	ATG GTT GGG AGG GAA T
N2 Forward	TGG TCA AAG CCG CAA TG
N2 Reverse	CAG CGG AAA GCC KAA TCG
Sonda N2 ¹⁴	ATT ACA GGA TTT GCA CTT TTT

2.4.3 Aislamiento viral

La descripción de los pasos generales en el desarrollo del aislamiento viral se explican en la figura 2-2 e inicia con la selección de las muestras positivas a la prueba qRT-PCR que tuviesen una mayor concentración de antígeno viral. El intento de aislamiento viral se realizó por medio de la inoculación del homogenizado de tejido pulmonar en los huevos

¹¹ Sonda marcada en el extremo 5' con el reportero FAM y en el extremo 3' con el BHQ1 (Blackhole Quencher 1)

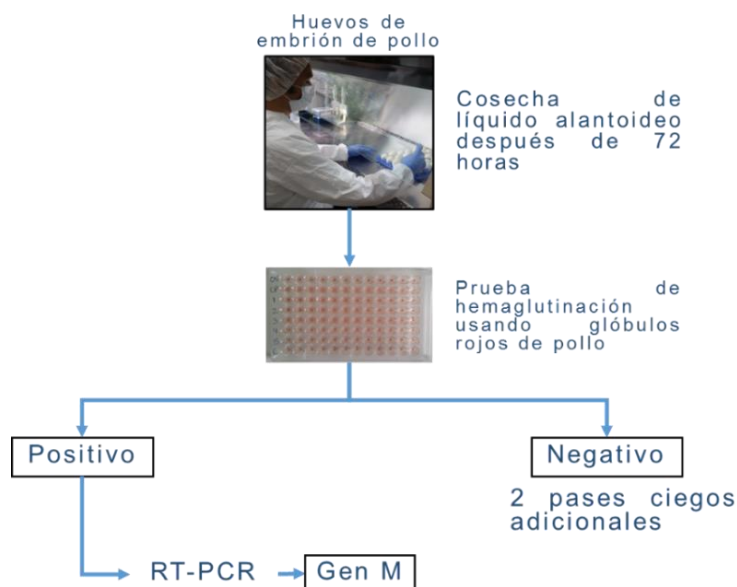
¹² Sondas marcadas en el extremo 5' con el reportero FAM y marcada internamente con el quencher BHQ1 en un residuo "T" y posee una modificación en el extremo 3' para prevenir la extensión para *Taq* polimerasa

¹³ Sonda marcada en el extremo 5' con el reportero 6FAM y con el quencher MGB (minor groove binder) en el extremo 3'

¹⁴ Sonda marcada en el extremo 5' con el reportero VIC y con el quencher MGB (minor groove binder) en el extremo 3'

de embrión de pollo SPF (libres de patógenos específicos) de nueve a 11 días de incubación. Se utilizó un volumen de 0.2 mL de la suspensión en la inoculación por la vía de la cavidad alantoidea, y luego de ser sometidos a un periodo de incubación por 72 horas a una temperatura de 37°C (incubadora Presicion® modelo 1020), fueron observados diariamente al ovoscopio para verificar viabilidad de los embriones. El líquido alantoideo recolectado al final del proceso de incubación fue analizado mediante una prueba de hemaglutinación (HA) utilizando una solución de glóbulos rojos de pollo SPF al 0.5%, para detectar la presencia de un agente hemaglutinante. Posteriormente, los resultados positivos a la prueba de HA fueron confirmados a través de un análisis de RT-PCR convencional dirigido a la amplificación del gen M del virus de influenza A y los resultados negativos se confirmaron mediante dos pases ciegos adicionales para confirmar la ausencia del virus.

Figura 2-2: Diagrama de actividades para la realización del aislamiento¹⁵



Para la detección específica del virus de influenza A se realizó un ensayo de RT-PCR convencional para la detección del gen M, llevando a cabo una transcripción inversa con las siguientes concentraciones de trabajo: 2.5 μ M del primer Uni12 (5'-

¹⁵ Descripción gráfica de las actividades para el análisis de muestras mediante aislamiento viral en huevos de embrión de pollo SPF, utilizando las técnicas de hemaglutinación y RT-PCR para la confirmación

AGCAAAACGAAG-3'), 1 mM de dNTP, 1X del búfer 5X *First strand buffer* (50 mM Tris-HCL, 35 mM KCL, 3 mM MgCl₂), 0.005 M of DTT (Dithiothreitol), 2U/μL de la enzima RNaseOUT (Invitrogen, Corp., CA, USA), 10U/μL de la enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Corp., CA, USA) y 4 μL del ARN extraído para un volumen final de 20 μL. El perfil térmico utilizado consistió de un ciclo inicial a 65°C por 3 minutos, un ciclo de transcripción inversa con 42°C de temperatura por 60 minutos y un ciclo final de inactivación a 70°C por 15 minutos. En la reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25 μL con una concentración de 1X del búfer 5X de PCR (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCL), 3 mM de MgCL₂, 0.6 μM de cada juego de primer (Tabla 2-3), 0.4 mM de dNTP, 0.05 U/μL de la enzima ADN polimerasa *Taq Platinum* (Invitrogen, Corp., CA, USA) y se adicionaron 2 μL del ADNc sintetizado. El perfil térmico incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización (94°C por 1 minutos), hibridación (53.5°C por un minuto) y elongación a 72°C por 5 minutos. El fragmento amplificado tenía una extensión esperada de 153 pb y lo productos fueron analizados en una electroforesis con un voltaje constante de 85 V durante 60 minutos, utilizando solución búfer TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 1 mM), gel agarosa al 1% (9012-36-6 Amresco®) y EZ *vision* (Amresco®) como búfer de carga y agente intercalante para la visualización y la captura de imágenes se realizó con el fotodocumentador Gel Doc 1000 de marca Biorad®.

Tabla 2-3: Primers usados para la amplificación de un segmento del gen M por RT-PCR

Primers	Secuencia (5'>3')
M Forward	ACG GAT GGG AGT GCA GAT AC
M Reverse	GAA GGC CCT CTT TTC AAA CC

2.5 Resultados

Como resultado de este estudio se demostró, utilizando pruebas de análisis molecular, la presencia del virus de influenza A en muestras de cerdos procedentes de cinco de las 11 regiones analizadas (Cundinamarca, Eje Cafetero, Antioquia, Valle del Cauca y Meta). Se identificaron 44 muestras positivas al virus de influenza A, a partir del total de 369 evaluadas, lo que representa una proporción del 11.9% de los análisis realizados (Tabla

2-4). La mayor distribución de muestras positivas correspondió a las regiones de Cundinamarca y Antioquia, mostrándose un porcentaje de detección molecular de 17.5% y 18.4%, respectivamente. Las pruebas de subtipificación adicionales por medio de qRT-PCR caracterizaron a la cepa H1N1pdm09 en dos muestras recolectadas en Antioquia y una muestra procedente de Cundinamarca. Por otro lado, no se pudo demostrar la presencia de virus del subtipo H3N2 a través de análisis moleculares de las muestras analizadas. Por otro lado, no se pudo demostrar la presencia de virus del subtipo H3N2 a través de análisis moleculares de las muestras analizadas.

Tabla 2-4: Resultados obtenidos en el análisis por medio de qRT-PCR

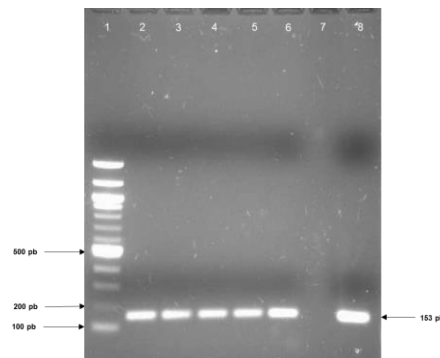
Región	Cundinamarca	Eje Cafetero	Antioquia	Valle del Cauca	Meta
Muestras positivas	14	3	23	3	1
Subtipificación	1 ¹⁶	0	2 ¹⁶	0	0
Porcentaje	17.5%	15%	18.4%	5.5%	5.5%

2.6 Aislamiento viral

Fue posible la obtención de cinco aislamientos virales como resultado de la inoculación en huevos de embrión de pollo, confirmándose que correspondían a virus de influenza A de acuerdo con los resultados de la prueba de hemaglutinación y el análisis de RT-PCR convencional para la detección del gen de la matriz (Figura 2-3). Uno de los aislamientos identificado como A/swine/Colombia/1-019/2015 se obtuvo a partir de muestras de cerdos de Cundinamarca, mientras que los cuatro restantes (A/swine/Colombia/3-015/2015, A/swine/Colombia/3-020/2015, A/swine/Colombia/3-021/2015, A/swine/Colombia/3-027/2015) fueron aislados a partir de muestras tomadas de cerdos procedentes de Antioquia. El análisis de subtipificación por qRT-PCR reveló que estas cepas poseían características moleculares asociadas a la cepa H1N1pdm09.

¹⁶ Subtipificación positiva para la cepa H1N1pdm09

Figura 2-3: Confirmación de los aislamientos positivos por medio de RT-PCR¹⁷



2.7 Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la circulación de virus de influenza en cerdos en cinco de las 11 regiones geográficas de Colombia que fueron analizadas, y corroboran que el virus continua circulando y es causante infecciones en los animales en tres de las regiones donde se concentra una gran proporción de las granjas de producción de cerdos en el país (Cundinamarca, Antioquia y Valle), (Instituto Colombiano Agropecuario, 2016). Vale la pena mencionar que de acuerdo a investigaciones realizadas previamente por nuestro grupo de investigación en estas mismas regiones se evidenció la presencia y se lograron aislamientos de virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásico y H1N1pdm del 2009 (Ramirez-Nieto, 2012). Teniendo en cuenta lo anterior, se demuestra que los virus de influenza se han establecido de manera permanente en las explotaciones porcinas sugiriendo la existencia de flujos de transmisión permanentes entre los cerdos como lo han demostrado algunos estudios en otros países (Pereda et al., 2011; Tremblay et al., 2011; Chiapponi et al., 2014; Nonthabenjawan et al., 2014), favoreciendo en este caso el establecimiento de una enfermedad con carácter endémico en la población de cerdos de Colombia.

En cuanto a la estrategia utilizada, es evidente que las plantas de beneficio pueden ser una fuente importante para obtener información para el monitoreo de estos y

¹⁷ Electroforesis de productos obtenidos mediante el análisis de RT-PCR para la amplificación de un fragmento de 153 pb del gen M. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 2 al 6: aislamientos positivos al virus de influenza; carril 7: control negativo; carril 8: control positivo.

probablemente otros agentes no solo de tipo viral sino bacteriano, ya que además de brindar una mayor cobertura de individuos y/o regiones procedentes de todo el territorio nacional, hace posible la obtención de un número de muestras de cerdos, en un periodo de tiempo que sería imposible de alcanzar a nivel de explotaciones de manera individual, debido a las limitaciones en cuanto a medidas de bioseguridad y manejo de animales, lo cual coincide con otros estudios realizados alrededor del mundo (Zhu et al., 2011; Qi et al., 2012; Fan et al., 2012; Chen et al., 2013; Pascua et al., 2013; Qiao et al., 2014; Lee et al., 2015).

Es de resaltar que las muestras de tejido pulmonar de cerdos tomadas en condiciones *postmortem* demostraron ser útiles para realizar no solo pruebas de detección molecular y establecer la presencia del virus de influenza, sino que además permitió obtener aislamientos de cepas virales, los cuales fueron utilizados para realizar análisis de caracterización molecular y filogenia, brindando un potencial mayor como alternativa para llevar a cabo estudios de epidemiología molecular, eco-biología, patogénesis y evaluación *in vivo* e *in vitro* de los aislamientos obtenidos, convirtiéndose en una fuente importante para crear un banco de cepas de campo que permita conocer el comportamiento de los virus de influenza en condiciones locales, anticipando el establecimiento de estrategias de control y/o prevención basadas en un conocimiento cierto.

Por otra parte, es importante recalcar que los ensayos moleculares permitieron la detección de virus de influenza en animales clínicamente sanos, lo cual podría evidenciar el mantenimiento de un estado subclínico de la infección que se prolonga hasta la etapa final de sacrificio, haciendo necesario determinar qué mecanismos o factores de tipo ecológico y/o epidemiológico favorecen el mantenimiento de la infección en granjas tecnificadas con buenas prácticas de manejo, donde es de esperar que los animales hayan desarrollado una respuesta inmune como resultado de la exposición natural al virus, lo cual representan un factor importante a tener en cuenta en los programas de control instaurados. Esto concuerda con lo encontrado en otras investigaciones (Bowman et al., 2012; Dagan et al., 2014; Takemae et al., 2016) y demuestra la importancia de realizar estudios tendientes a esclarecer los mecanismos que favorecen el mantenimiento de este agente en un estado de infección subclínica que podría ser

exacerbada bajo condiciones de estrés o debido a la presencia de otros microorganismos, lo cual hace que cobre mayor relevancia el establecer la presencia del virus en las poblaciones porcinas. Se hace necesario entender y establecer la importancia del mantenimiento de una infección de este tipo y las consecuencias de la misma, las cuales pueden ser subestimadas o atribuidas a causas externas, ignorando de esta manera el impacto negativo en los parámetros productivos de ganancia de peso o en un aumento en la predisposición a otras enfermedades como consecuencia de la presencia de una infección por virus de influenza A no detectada en los animales; se requiere por tanto estudiar estos aspectos y determinar estrategias de control apropiadas, tomando en consideración las condiciones de producción de nuestro país.

Los resultados aquí obtenidos permiten confirmar la predominancia de la cepa H1N1pdm09, la cual se estableció después de su surgimiento en 2009, cuando encontró una población de cerdos susceptibles a este nuevo subtipo en nuestro país. La circulación continua de esta cepa pone en consideración la necesidad de caracterizar la existencia de ventajas evolutivas promoviendo la adquisición de mecanismos de adaptación que le permiten prevalecer y predisponer al desplazamiento de virus de influenza de otros orígenes, como los de tipo clásico, lo cual probablemente ocurrió en nuestro medio, ya que virus de influenza del tipo clásico fueron detectados hasta 2008 y posteriormente fueron reemplazados por el subtipo H1N1pdm09. Este hallazgo ha sido descrito en otras publicaciones (Sakabe, Ozawa, Takano, Iwastuki-Horimoto, & Kawaoka, 2011; Wörmann et al., 2016) y resalta la necesidad de desarrollar pruebas de caracterización de los virus circulantes en la población de cerdos del país, que permitan conocer los cambios genéticos que han ocurrido durante los últimos años y establecer su transcendencia y posible impacto para la salud pública y la sanidad animal, lo cual muestra la necesidad de seguir estudiando la dinámica de circulación del virus de influenza en la población de cerdos de Colombia.

Es importante mencionar que los análisis de secuenciación y filogenia son necesarios para establecer el probable origen de las cepas aisladas, es decir describir las cadenas de infección que demuestran la procedencia de estos agentes y la(s) especie(s) que pueden estar implicadas en los flujos de transmisión, pudiendo establecer nuevas introducciones de las cepas de influenza hacia la población de cerdos. Considerando las

características genéticas de alta variabilidad molecular que determinan la aparición de nuevas adaptaciones que pueden estar relacionadas con un incremento en la virulencia, como se ha podido establecer en otras investigaciones (Brookes et al., 2010; Wenjun Ma et al., 2012; Mancera Gracia et al., 2017) es indispensable ampliar el estudio involucrando otros huéspedes potenciales que pueden contribuir en la compleja interacción y generación de cepas con características diferentes.

2.8 Conclusiones

El virus de influenza A está presente y circulando en explotaciones de cerdos de diferentes procedencias en el territorio nacional. La detección molecular de este virus en las muestras de tejido pulmonar recolectadas *postmortem* a partir de animales clínicamente sanos resalta su utilidad en el diagnóstico de agentes virales y en la detección de infecciones de tipo subclínico, lo cual tiene una gran significancia en el entendimiento de la epidemiología de infección por virus de la influenza tanto en animales como en el hombre.

La estrategia de muestreo utilizada a nivel de plantas de beneficio provee diversas ventajas en comparación con la toma de muestras a nivel de las granjas, incluyendo aquellos aspectos que se asocian con las restricciones para el ingreso a las granjas y el seguimiento de rutinas que cumplan con los requisitos de bioseguridad para prevenir la entrada de patógenos a las explotaciones animales. En este sentido, también brinda una mayor practicidad y facilidad durante la recolección, que determina la recolección de un mayor número de muestras y disminuye el tiempo invertido durante el proceso. Así mismo, se eliminan factores de estrés que pueden tener un efecto en el bienestar al evitar la manipulación individual de los animales en la granja. Por otro lado, es importante mencionar que al analizar muestras tomadas en animales al sacrificio se omite parte del panorama que puede existir en las granjas, ya que no se incluyen aquellos grupos etarios que pueden llegar a tener una mayor susceptibilidad a este agente viral, pero se puede obtener una muestra de los cerdos de diferentes granjas a nivel nacional.

La obtención de nuevos aislamientos ofrece la posibilidad de generar un banco de cepas del virus que puede ser utilizado en estudios moleculares que permitan conocer la

evolución del virus de influenza en nuestro país, y además realizar ensayos biológicos y/o inmunológicos para comprender los mecanismos de infección, patogénesis y control de la influenza en cerdos y en otras especies susceptibles.

Por otro lado, teniendo en cuenta que no fue posible detectar virus del subtipo H3N2 en las muestras analizadas, a pesar de que su presencia ha sido confirmada en estudios serológicos desarrollados previamente en Colombia, resalta la necesidad de complementar esta información con nuevos estudios de vigilancia dentro de los sistemas de producción, para extender el alcance de la evaluación molecular que permitan demostrar la existencia o no de cepas de otros linajes o subtipos circulando en las explotaciones porcinas del país.

Los resultados obtenidos permiten analizar el contexto epidemiológico de Colombia relacionado con la circulación del virus de influenza en explotaciones comerciales de cerdos, haciendo evidente la necesidad de continuar con nuevas investigaciones, a través de la implementación de un plan de monitoreo a nivel de los sistemas productivos en granja, que permitirá la descripción de los flujos de transmisión, la determinación de los factores de riesgo presentes en estas instalaciones y la prevalencia asociada a cada uno de los grupos etarios presentes en la granja. De igual forma, es importante la exploración de otras especies de interés dentro de la ecología del virus de influenza para detallar los aspectos relacionados con los factores de transmisión inter-especie y cambios en la dinámica de adaptación de huéspedes.

Es claro el papel clave que desempeñan los virus de influenza en el desarrollo de eventos de tipo pandémico en la población humana y las repercusiones relacionadas con la aparición de un virus con una patogenicidad y transmisibilidad impredecibles. Estos aspectos deben ser evaluados periódicamente con el objetivo de detectar cambios moleculares que pueden estar asociados a la adquisición de nuevas adaptaciones, o diferencias en patogenicidad y/o virulencia de las cepas del virus circulando en nuestro medio.

Bibliografía

- Air, G. M. (2015). Influenza virus antigenicity and broadly neutralizing epitopes. *Current Opinion in Virology*, 11, 113–121. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.03.006>
- Alvarez, J., Sarradell, J., Kerkaert, B., Bandyopadhyay, D., Torremorell, M., Morrison, R., y Perez, A. (2015). Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Preventive Veterinary Medicine*, 121(3–4), 240–245. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.07.003>
- Bowman, A. S., Nolting, J. M., Nelson, S. W., y Slemons, R. D. (2012). Subclinical influenza virus A infections in pigs exhibited at agricultural fairs, Ohio, USA, 2009–2011. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12), 1945–1950. <http://doi.org/10.3201/eid1812.121116>
- Brookes, S. M., Núñez, A., Choudhury, B., Matrosovich, M., Essen, S. C., Clifford, D., y Brown, I. H. (2010). Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs. *PLoS ONE*, 5(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009068>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2009). Swine Influenza. In *CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1)* (pp. 1–7).
- Chen, Y., Zhang, J., Qiao, C., Yang, H., Zhang, Y., Xin, X., y Chen, H. (2013). Co-circulation of pandemic 2009 H1N1, classical swine H1N1 and avian-like swine H1N1 influenza viruses in pigs in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 13, 331–338. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.09.021>
- Chiapponi, C., Baioni, L., Luppi, A., Moreno, A., Castellan, A., y Foni, E. (2014). Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding. *Veterinary Microbiology*, 174(1–2), 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.026>
- Cucaita, A. (2005). *Estudio comparativo de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI) y la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos frente al virus de la influenza porcina*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Dagan, B., Services, F. V., Health, A., Dagan, B., Consultant, V. P., Health, A., y Agency-veybridge, V. L. (2014). Seroepidemiology Survey and Isolation of Swine Influenza Viruses from Subclinical Infections in Israel During the Years 2009–2011. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 69(2), 62–67.
- Dangi, T., y Jain, A. (2012). Influenza Virus: A Brief Overview. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 82(1), 111–121. <http://doi.org/10.1007/s40011-011-0009-6>
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2014). *Tercer censo Nacional Agropecuario*.
- Fan, X., Zhu, H., Zhou, B., Smith, D. K., Chen, X., Lam, T. T.-Y., y Guan, Y. (2012).

- Emergence and dissemination of a swine H3N2 reassortant influenza virus with 2009 pandemic H1N1 genes in pigs in China. *Journal of Virology*, 86(4), 2375–8. <http://doi.org/10.1128/JVI.06824-11>
- Fanning, T. G., Reid, a H., y Taubenberger, J. K. (2000). Influenza A virus neuraminidase: regions of the protein potentially involved in virus-host interactions. *Virology*, 276(2), 417–423. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0578>
- Greenbaum, B. D., y Ghedin, E. (2015). Viral evolution: beyond drift and shift. *Current Opinion in Microbiology*, 26, 109–115. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.015>
- Greenbaum, B. D., Li, O., Poon, L., Levine, A., y Rabadan, R. (2015). Viral reassortment as an information exchange between viral segments, 109(9), 3341–3346. <http://doi.org/10.1073/pnas.11>
- Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M., y Nielsen, O. L. (2010). An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2–3), 120–131. <http://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.012>
- Hanssen, H., Hincapié, O., y López, J. (1977). Influenza en porcinos de Antioquia, Colombia. *Pan American Journal of Public Health*, 82(1).
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Brecher, M., White, J. M., y Steven, A. C. (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19123–19127. <http://doi.org/10.1073/pnas.0607614103>
- (Instituto Colombiano Agropecuario), (I. C. A) (2016). Censo Pecuario Nacional-2016. Retrieved from www.ica.gov.co
- Ito, T., Gorman, O. T., Kawaoka, Y., Bean, W. J., y Webster, R. G. (1991). Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *Journal of Virology*, 65(10), 5491–5498.
- Janke, B. H. (2013). Clinicopathological Features of Swine Influenza. In J. A. Richt y R. J. Webby (Eds.), *Swine Influenza: Current topics in microbiology and immunology* (pp. 69–83). Verlag: Springer. http://doi.org/10.1007/82_2013_308
- Kappor, S., y Dhama, K. (2014). Clinical features of Influenza Viruses. In *Insight into Influenza Viruses of Animals and Humans* (pp. 103–110). Switzerland: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-05512-1>
- Kong, W., Wang, F., Dong, B., Ou, C., Meng, D., Liu, J., y Fan, Z.-C. (2015). Novel reassortant influenza viruses between pandemic (H1N1) 2009 and other influenza viruses pose a risk to public health. *Microbial Pathogenesis*, 89, 62–72. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.002>
- Kothalawala, H., Toussaint, M. J. M., y Gruys, E. (2006). An overview of swine influenza. *The Veterinary Quarterly*, 28(2), 46–53. <http://doi.org/10.1080/01652176.2006.9695207>

- Lee, J. H., Pascua, P. N. Q., Decano, A. G., Kim, S. M., Park, S.-J., Kwon, H.-I., y Choi, Y. K. (2015). Evaluation of the zoonotic potential of a novel reassortant H1N2 swine influenza virus with gene constellation derived from multiple viral sources. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 378–393. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.06.005>
- Ma, W., Liu, Q., Bawa, B., Qiao, C., Qi, W., Shen, H., y Richt, J. A. (2012). The neuraminidase and matrix genes of the 2009 pandemic influenza H1N1 virus cooperate functionally to facilitate efficient replication and transmissibility in pigs. *Journal of General Virology*, 93(6), 1261–1268. <http://doi.org/10.1099/vir.0.040535-0>
- Mair, C. M., Ludwig, K., Herrmann, A., y Sieben, C. (2014). Receptor binding and pH stability — How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(4), 1153–1168. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.004>
- Mancera Gracia, J. C., Van den Hoecke, S., Richt, J. A., Ma, W., Saelens, X., y Van Reeth, K. (2017). A reassortant H9N2 influenza virus containing 2009 pandemic H1N1 internal-protein genes acquired enhanced pig-to-pig transmission after serial passages in swine. *Scientific Reports*, 7(1), 1323. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-01512-x>
- Mancipe Jiménez, L. F., Ramírez Nieto, G., Vera Alfonso, V., y Jaime Correa, J. (2014). Association of swine influenza H1N1 pandemic virus (SIV-H1N1p) with porcine respiratory disease complex in sows from commercial pig farms in Colombia. *Virologica Sinica*, 29(4), 242–249. <http://doi.org/10.1007/s12250-014-3471-5>
- Mehle, A., Dugan, V. G., Taubenberger, J. K., y Doudna, J. A. (2012). Reassortment and Mutation of the Avian Influenza Virus Polymerase PA Subunit Overcome Species Barriers. *Journal of Virology*, 86(3), 1750–1757. <http://doi.org/10.1128/JVI.06203-11>
- Mogollon, J., Rincón, M., Preciado, P., Cepeda, M., y S., R. (2003). Reactividad serológica frente al virus de la influenza porcina en explotaciones intensivas de Colombia. *Referencias Para Consultorios MV (Bogotá)*, (6), 15–20.
- Neira, V., Rabinowitz, P., Rendahl, A., Paccha, B., Gibbs, S. G., y Torremorell, M. (2016). Characterization of viral load, viability and persistence of influenza a virus in air and on surfaces of swine production facilities. *PLoS ONE*, 11(1), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0146616>
- Nelson, M. I., Gramer, M. R., Vincent, A. L., y Holmes, E. C. (2012). Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *Journal of General Virology*, 93(Pt_10), 2195–2203. <http://doi.org/10.1099/vir.0.044974-0>
- Neumann, G., y Kawaoka, Y. (2015). Transmission of influenza A viruses. *Virology*, 479–480C, 234–246. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.009>
- Nonthabenjawan, N., Chanvatik, S., Chaiyawong, S., Jairak, W., Boonyapisusopha, S., Tuanudom, R., y Amonsin, A. (2014). Genetic diversity of swine influenza viruses in Thai swine farms, 2011–2014. *Virus Genes*, 50(2), 221–230. <http://doi.org/10.1007/s11262-014-1153-x>

- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E., y Fouchier, R. A. M. (2006). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, 312(5772), 384–388. <http://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Pascua, P. N. Q., Lim, G. J., Kwon, H. II, Park, S. J., Kim, E. H., Song, M. S., y Choi, Y. K. (2013). Emergence of H3N2pM-like and novel reassortant H3N1 swine viruses possessing segments derived from the A (H1N1)pdm09 influenza virus, Korea. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7, 1283–1291. <http://doi.org/10.1111/irv.12154>
- Pereda, A., Rimondi, A., Cappuccio, J., Sanguinetti, R., Angel, M., Ye, J., y Perez, D. R. (2011). Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 5(6), 409–12. <http://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00246.x>
- Qi, X., Pan, Y., Qin, Y., Zu, R., Tang, F., Zhou, M., y Song, Y. (2012). Molecular characterization of avian-like H1N1 swine influenza a viruses isolated in Eastern China, 2011. *Virologica Sinica*, 27(5), 292–8. <http://doi.org/10.1007/s12250-012-3262-9>
- Qiao, C., Liu, L., Yang, H., Chen, Y., Xu, H., y Chen, H. (2014). Novel triple reassortant H1N2 influenza viruses bearing six internal genes of the pandemic 2009/H1N1 influenza virus were detected in pigs in China. *Journal of Clinical Virology*, 61(4), 529–534. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.10.014>
- Ramirez-Nieto, G. C. (2012). First isolation and identification of H1N1 swine influenza viruses in Colombian pig farms. *Health*, 4(10), 983–990. <http://doi.org/10.4236/health.2012.430150>
- Rodriguez-Frandsen, A., Alfonso, R., y Nieto, A. (2015). Influenza virus polymerase: Functions on host range, inhibition of cellular response to infection and pathogenicity. *Virus Research*, 209, 1–16. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.017>
- Sakabe, S., Ozawa, M., Takano, R., Iwastuki-Horimoto, K., y Kawaoka, Y. (2011). Mutations in PA, NP, and HA of a pandemic (H1N1) 2009 influenza virus contribute to its adaptation to mice. *Virus Research*, 158(1–2), 124–129. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.022>
- Scholtissek, C. (1994). Source for Influenza Pandemics. *European Journal of Epidemiology*, 10(4), 456–458. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3520977>
- Shaw, M. L., y Palese, P. (2013). Orthomyxoviridae. In D. Knipe & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 1151–1185). Philadelphia, USA, USA: Wolter Kuwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Smith, G. J. D., Bahl, J., Vijaykrishna, D., Zhang, J., Poon, L. L. M., Chen, H., y Guan, Y. (2009). Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28), 11709–12. <http://doi.org/10.1073/pnas.0904991106>

- Solbak, S. M. Ø., Sharma, A., Bruns, K., Röder, R., Mitzner, D., Hahn, F., y Fossen, T. (2013). Influenza A virus protein PB1-F2 from different strains shows distinct structural signatures. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1834(2), 568–582. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.11.009>
- Suzuki, T., Horiike, G., Yamazaki, Y., Kawabe, K., Masuda, H., Miyamoto, D., y Suzuki, Y. (1997). Swine influenza virus strains recognize sialylsugar chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *FEBS Letters*, 404(2–3), 192–196. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00127-0](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00127-0)
- Takemae, N., Shobugawa, Y., Nguyen, P. T., Nguyen, T., Nguyen, T. N., To, T. L., y Saito, T. (2016). Effect of herd size on subclinical infection of swine in Vietnam with influenza A viruses. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 227. <http://doi.org/10.1186/s12917-016-0844-z>
- Taubenberger, J. K., y Morens, D. M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annual Review of Pathology*, 3, 499–522. <http://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>
- Torremorell, M., Allerson, M., Corzo, C., Diaz, A., y Gramer, M. (2012). Transmission of Influenza A Virus in Pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(SUPPL. 1), 68–84. <http://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01300.x>
- Tremblay, D., Allard, V., Doyon, J.-F., Bellehumeur, C., Spearman, G., Harel, J., y Gagnon, C. (2011). Emergence of a new swine H3N2 and pandemic (H1N1) 2009 Influenza A virus reassortant in two Canadian animal populations, mink and swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4386–4390. <http://doi.org/10.1007/s11548-012-0737-y>
- Vasin, A. V., Temkina, O. A., Egorov, V. V., Klotchenko, S. A., Plotnikova, M. A., y Kiselev, O. I. (2014). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research*, 185, 53–63. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>
- Vijaykrishna, D., Poon, L. L. M., Zhu, H. C., Ma, S. K., Li, O. T. W., Cheung, C. L., y Guan, Y. (2010). Reassortment of Pandemic H1N1/2009 Influenza A Virus in Swine. *Science*, 328(5985), 1529–1529. <http://doi.org/10.1126/science.1189132>
- Wang, J.-Y., Chen, Z.-L., Li, C.-S., Cao, X., Wang, R., Tang, C., y Liu, H.-J. (2015). The distribution of sialic acid receptors of avian influenza virus in the reproductive tract of laying hens. *Molecular and Cellular Probes*, 29(2), 129–134. <http://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.01.002>
- Webster, R. G. (1998). Influenza: An emerging disease. *Emerging Infectious Diseases*, 4(3), 436–441. <http://doi.org/10.3201/eid0403.980325>
- Wörmann, X., Lesch, M., Welke, R.-W., Okonechnikov, K., Abdurishid, M., Sieben, C., y Karlas, A. (2016). Genetic characterization of an adapted pandemic 2009 H1N1 influenza virus that reveals improved replication rates in human lung epithelial cells. *Virology*, 492, 118–129. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2016.02.002>

- Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., y Gao, G. F. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*, 22(4), 183–191.
<http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.010>
- Yoon, S.-W., Webby, R., y Webster, R. G. (2014). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. In R. W. Compans & M. Oldstone (Eds.), *Current Topics in Microbiology and immunology Influenza Pathogenesis and Control-Volume I* (Volume 385, pp. 359–370). Switzerland: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-1115-1>
- Zhu, H., Zhou, B., Fan, X., Lam, T. T. Y., Wang, J., Chen, a., y Guan, Y. (2011). Novel Reassortment of Eurasian Avian-Like and Pandemic/2009 Influenza Viruses in Swine: Infectious Potential for Humans. *Journal of Virology*, 85(20), 10432–10439.
<http://doi.org/10.1128/JVI.05352-11>
- Zhu, W., Yang, S., Dong, L., Yang, L., Tang, J., Zou, X., y Shu, Y. (2015). The repeated introduction of the H3N2 virus from human to swine during 1979–1993 in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 20–24.
<http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.001>

3. Molecular surveillance of influenza A virus in Colombian slaughterhouse pigs demonstrates subclinical infections

3.1 Abstract

Swine influenza is a highly contagious respiratory disease caused by an *influenzavirus A*, which is a member of the *Orthomyxoviridae* family. Currently, there are 18 Hemagglutinin (HA) and 11 Neuraminidase (NA) virus subtypes which are characterized according to surface glycoproteins, including those ones recently detected in bats. There are two variation mechanisms considered to be the main source for rapid evolution of influenza virus: antigenic drift and shift (reassortment), that operate in a cooperative mode for the emergence of new strains that may acquire pandemic potential. The appearance and spread of 2009 pandemic H1N1 (H1N1pdm09) influenza virus in pig population worldwide played an important role that led to major molecular changes in swine influenza lineages. This situation was translated into the co-circulation of pandemic and endemic strains and ultimately into a predisposition for the increase of reassortment events. Considering these aspects and based on the results of previous studies in our research team, it is evident that there is a need to provide new information about swine influenza viruses circulating in Colombia. We carried out a survey to analyze 788 lung tissue samples collected during 2015-2017 from pigs at slaughterhouses located in 11 different geographic regions of Colombia. The samples were prepared and analyzed by initial qRT-PCR test targeting the matrix (M) gen of Influenza A virus. Subsequently, subtyping analysis was performed on positive samples employing protocols for detection of the swine influenza virus Nucleoprotein (NP) gene, 2009 pandemic H1N1 influenza virus HA gene, and swine H3N2 HA and NA genes. Positive samples were inoculated in 9-10 day old specific pathogen free (SPF) embryo chicken eggs. After an incubation period of 72 hours, positive isolates were confirmed by hemagglutination test and RT-PCR analysis for

specific detection of influenza A virus. Full length amplification of HA, NA, M and NS genes of collected isolates were used for sequencing and phylogenetic analysis. Our results show that we were able to detect the influenza A virus from 116 samples collected in five geographic regions, 13 of which were identified as H1 subtype, and 3 as H1N1pdm09 virus after a subtyping test. Recovery and evaluation of 5 influenza A field isolates from the regions of Antioquia and Cundinamarca established that all four analyzed genes were grouped with H1N1pdm09 viruses reported around the world from human and swine hosts, showing no evidence of genes from additional lineages. Results described in this study confirm that swine influenza virus is currently circulating in the main pig producing areas of Colombia. This also demonstrates the presence of H1N1pdm09 subtype as a causative agent for infections in Colombian pigs as no viruses from other lineages could be established. Such findings highlight the importance of extending surveillance research to additional locations and to different species in order to examine ecologic aspects associated to the transmission pathway and risk factor for influenza virus. The integration of these findings and recording of new information will help detect new molecular changes and anticipate the emergence of new pandemic and/or endemic events.

Keywords: 2009 pandemic H1N1 influenza virus, Colombia, lung tissue, molecular variation mechanisms, qRT-PCR, slaughterhouses, swine Influenza virus.

3.2 Introduction

Swine influenza is a highly contagious disease and endemic in the pig population worldwide (Brown, 2000). The causative agent is an influenzavirus type A, a member of the Orthomyxoviridae family, which possesses a negative, single stranded and segmented RNA genome (Harris et al., 2006; Shaw & Palese, 2013). Influenza A virus can be further classified into different subtypes according to the molecular and antigenic characteristics on the major surface glycoproteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) (Dangi & Jain, 2012); currently there are 18 HA and 11 NA subtypes that have been found in birds and mammalian hosts (Munster et al., 2007; B. Olsen et al., 2006; Webster, 1998; Wu et al., 2014) (Munster et al., 2007; B. Olsen et al., 2006;

Webster, 1998; Wu et al., 2014). H1N1, H1N2 and H3N2 subtypes are considered the most prevalent and they are the most frequently associated with infections in pigs (Lyoo, et al., 2014; Yoon et al., 2014).

Two variation mechanisms in the viral genome are associated to the continuing evolution of influenza virus. One of them, the antigenic drift involves gradual mutations occurring in one or more viral segments leading to minor changes in proteins that can accumulate over time, this is promoted by the RNA polymerase's high error rate during the replication process (Air, 2015; Fiers et al., 1981; Greenbaum & Ghedin, 2015). The other mechanism is known as shift or reassortment and involves the exchange of viral segments when simultaneous infection with two different virus subtypes occurs (Gerber et al., 2014; Greenbaum et al., 2015; Zhang et al., 2013). Although not all new strains and subtypes generated as a result of these mechanisms are successfully established, some of them may give rise to virus with pandemic potential and/or acquire new adaptations that will allow the virus to cross host range barriers (Mehle et al., 2012; Smith et al., 2009).

Pigs play a major role in the generation of new viruses, as they are considered "mixing vessels" because they are able to express sialic acid receptors with α -2,6 and α -2,3 linkage conformation on their epithelial cells (Ito & Kawaoka, 2000; Scholtissek, 1994). The sialic acid receptor with α -2,6 linkage are mainly recognized by human influenza viruses (Neumann & Kawaoka, 2015), while it has been established that avian influenza viruses show preference for binding to molecules with α -2,3 linkage (Wang et al., 2015). Therefore, pigs are susceptible to infections by both human and avian origin influenza viruses (Suzuki et al., 1997). This particular characteristic creates the ideal situation where reassortment events between human/swine/avian influenza viruses may occur within pigs, generating new viruses that may potentially be transmitted to humans (Crisci et al., 2013). However, the transmission of human influenza virus towards pigs has been recently described as an important source of new viruses (Gramer, 2012; Nelson et al., 2012; Zhu et al., 2015). In this context, the transmission of 2009 pandemic H1N1 influenza virus back to pigs has contributed to the increase of genetic diversity of swine influenza viruses nowadays (Kong et al., 2015; Qu et al., 2011; Vijaykrishna et al., 2010; Zhu et al., 2011). This fact highlights the relevance in designing and performing continuous surveillance programs in order to get insight of the molecular characteristics of

the influenza viruses that circulate in the population in a particular geographic area (Ma et al., 2008).

Previous studies carried out in Colombia between 2008-2011 confirmed the presence of classical swine and pandemic influenza viruses in the population in the three main pig producing regions of the country (Mancipe et al., 2014; Ramirez-Nieto, 2012). However, it is necessary to update the information related to the characteristics of the influenza viruses in pigs circulating in the field, and new data needs to be recorded in order to design control measures to minimize economical losses and the epidemiological risks associated with this disease.

With the purpose of contributing to the knowledge of swine influenza virus in Colombia, we carried out a survey collecting samples from the respiratory tract of pigs at slaughterhouses located in different regions of Colombia. First, the samples were analyzed in order to establish the presence of influenza A virus by using molecular techniques and then virus isolation and characterization was attempted from positive samples.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Animal samples

The study was divided in three phases. The first consisted of an exploratory study of national coverage that intended to establish which geographical areas of the country could be the ones where influenza viral activity could be present. According to the results, the regions where positive samples were detected were chosen for sample collection for the second and third phases. As a result, a total of 788 lung tissue samples were collected at slaughterhouses from September 2015 to February 2017 from pigs. Of the 788 samples 369 corresponded to pigs of 11 different geographical regions and were used for a preliminary screening of the presence of Influenza A virus (Table 3-3). From the exploratory study, 5 out of the 11 regions resulted positive and these were chosen to continue sampling in the second and third phases. Total sample size was calculated according to a pig population of 3.263.075 (N) for the five geographic regions (Instituto

Colombiano Agropecuario, 2016), using an expected prevalence of 10% (p), according to the detection percentage in the exploratory phase, a significance of 95% (Z), a precision of 3% and a q value of 90% (1-10%). A total of 385 samples was calculated using the following formula:

$$n = \frac{NZ^2pq}{d^2(N-1)+Z^2pq} \quad n = \frac{3.263.075 (1.96)^2(0.10)(0.90)}{(0.03)^2(3.263.075-1)+1.96^2(0.10)(0.90)} = 385$$

According to this, a total of 400 samples was established, by increasing 3%, considering losses during collection, transport and preparation processes and divided by half for the second and third period. Samples were collected randomly by selecting 2-5 pigs from the same farm during the slaughter line. Distribution of samples on every period was done according to the proportion of pigs for each region as shown in Table 3-1, obtaining 216 and 203 samples for the second and third phases, respectively.

Table 3-1: Distribution of samples for Second and Third Phases

Region	Pig Population	Percentage	Proportion in 200 samples
Cundinamarca	521.647	16%	32
Eje Cafetero	334.992	10%	20
Antioquia	1.753.388	53%	106
Valle del Cauca	416.784	13%	26
Meta	236.264	8%	16
Total	3.263.075	100%	200

Each sample was collected in individual Nasco® bags under aseptic conditions and transported (encased in ice) to the virology laboratory at the National University (Bogotá). Once they arrived they were immediately prepared in tissue suspensions, by adding 90 mg of each sample to 600 µL of PBS (Phosphate-buffered saline, pH: 7.1±0.1), disrupting tissue by using 50 khz ultrasonic frequency (Cole-Parmer® 4710 Series). Aliquots of 200 µL were stores at 70°C for RNA/DNA extraction, using the High Pure Viral Nucleic Acid kit (Catalogue number 11858874001 Roche Life Science®) and RNAeasy Mini Kit (Qiagen®, CA, USA) following manufacturers' instructions.

3.3.2 Molecular detection of influenza A virus by qRT-PCR

qRT-PCR was conducted using TaqMan® hydrolysis probes for detecting influenza A virus (Inf A) matrix (M) gene, swine influenza (SW Inf A) virus NP gene and H1N1 swine (SW H1) influenza HA gene (Table 3-1), following the CDC protocol (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) (CDC Prevention, 2009). Further subtyping was performed for the detection of the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of the swine H3N2 virus subtype, following a multiplex qRT-PCR analysis using TaqMan® hydrolysis probes (Table 3-2) with modification of the Standard Operating Protocol provided by The University of Minnesota (MOL.SOP.218). qRT-PCR reactions were performed on a LightCycler 480 real time thermocycler (Roche Life Science®) utilizing the SuperScript™ III Platinum® One-step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen®, California, USA). Data analysis and recovery was carried out in the Roche LightCycler® software version 1.5. Negative results were considered when samples exhibited Cp values >39.

A mixture reaction for influenza A virus detection, used a final volume of 25 µL with a concentration of 1.25X of 2X Reaction Mix Invitrogen®, containing 1 µM of each forward and reverse primer, 0.25 µM of the specific probe, 0.5 µL of Superscript III RT/Platinum® *Taq* Mix and 5 µL of RNA extracted from each sample. Reverse transcription was done in a cycle of 50°C for 30 minutes, then a cycle for *Taq* inhibitor activation at 95°C for 2 minutes followed by 45 cycles for PCR amplification at 95°C for 15 seconds and 55°C for 30 seconds where fluorescence data was recorded.

For subtyping H3N2 virus, we used a final volume of 25 µL with a concentration of 1.25X of 2X Reaction Mix Invitrogen®, 0.5 µM of H3 forward primer, 0.75 µM of H3 Reverse primer, 0.75 µM of N2 forward primer, 1 µM of N2 Reverse primer, 0.3 µM of each probe, 0.5 µL of Superscript III RT/Platinum® *Taq* Mix and 5 µL of RNA extracted from each sample. Reverse transcription was done in a cycle of 50°C for 30 minutes, then a cycle for *Taq* inhibitor activation in 95°C for 15 minutes and afterwards 30 cycles of denaturation (94°C for 30 seconds), annealing (58°C for 1 minute), elongation (72°C for 1 minute), and finally another cycle for elongation 72°C for 7 minutes.

Table 3-2: Primers and probes for the detection of influenza A viruses

Primers and probes	Sequence (5'>3')
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA
InfA Probe ¹⁸	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC
SW InfA Probe ¹⁹	CYA CTG CAA GCC CA" T" ACA CAC AAG CAG GCA
SW H1 Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA
SW H1 Reverse	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGG
SW H1 Probe ¹⁸	CA GAA TAT ACA "T"CC RGT CAC AAT TGG ARA A
H3 Forward	CGC AAT MGC AGG TTT CAT AGA
H3 Reverse	GAT GCC TGA AAC CGT ACC A
H3 probe ²⁰	ATG GTT GGG AGG GAA T
N2 Forward	TGG TCA AAG CCG CAA TG
N2 Reverse	CAG CGG AAA GCC KAA TCG
N2 probe ²¹	ATT ACA GGA TTT GCA CTT TTT

¹⁸ Probe labeled at the 5' end with reporter molecule FAM and with the quencher, Backhole Quencher 1 (BHQ1) at the 3'-end

¹⁹ Probes labeled at the 5' end with the reporter molecule FAM and quenched internally at a modified "T" residue with BHQ1, with a modified 3'-end to prevent probe extension by *Taq* polymerase

²⁰ Probe labeled at the 5' end with reporter molecule 6FAM and with the quencher, Minor groove binder (MGB) at the 3'-end

²¹ Probe labeled at the 5' end with reporter molecule VIC and with the quencher, Minor groove binder (MGB) at the 3'-end

3.3.3 Virus isolation

From those samples that resulted positive to the molecular detection of influenza A virus, 10% tissue suspensions were prepared using PBS solution supplemented with 3% of antibiotics and antimycotic (Gibco®, penicillin, streptomycin y amphotericin B; Reference 15240096), then filtered and inoculated into the allantoic cavity of 9 to 10 day old specific pathogen free (SPF) embryonated chicken eggs. After 72 hours of incubation at 37°C and under humidity flow (Presicion® incubator model 1020), allantoic fluid was analyzed by hemagglutination test (HA) using 0.5% chicken red blood cells (RBC) and RT-PCR analysis for the detection of the influenza A matrix gene using those HA positive samples. Three blind passages were used before considering a sample as negative for virus isolation.

3.3.4 Sequencing analysis

280 µL of viral suspension was used for RNA extraction using QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen®, CA, USA). Reverse transcription reaction was prepared with 2.5 µM of Uni12 (5'-AGCAAACGAAG-3'), 1 mM of dNTP, 1X of First strand buffer (50 mM Tris-HCL, 35 mM KCL, 3 mM MgCl₂) 0.005 M of DTT (Dithiothreitol), 2U/µL of RNaseOUT (Invitrogen, Corp., CA, USA), 10U/µL of SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Corp., CA, USA), and 4 µL of extracted RNA for a final volume of 20 µL. Reverse transcription reaction was carried out in a heating cycle of 65°C for 5 minutes, a reverse transcription cycle at 42°C for 60 minutes and a final cycle at 70°C for 15 minutes. cDNA template was used for the amplification of the HA, NA, M and NS genes using primers as shown in table 3-3. In these reactions, a final volume of 25 µL with a concentration of 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCL), 3 mM of MgCl₂, 0.6 µM of each primer set, 0.4 mM of dNTP and 0.05 U/µL of Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Corp., CA, USA) was used and run under standard thermal conditions. PCR products were analyzed by electrophoresis using TAE buffer solution (Tris-acetate 0.04 M, EDTA 1 mM), in a 1% agarose gel (9012-36-6 Amresco®) and visualized by EZ vision (Amresco®). Purification of PCR products was accomplished with the QIA Quick Gel Extraction Kit (Qiagen®, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. Sequencing reactions of each gene

were carried out from PCR products using BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems®, USA)

Table 3-3: Primers for the amplification of the HA, NA, M and NS genes

Primers	Sequence (5'>3')
First HA segment	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG
	TCTGAAATGGGAGGCTGGTGTT
Second HA segment	TAGAGCCGGGAGACAAAATAACAT
	ATATCGTCTGATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT
First NA segment	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT
	TTACTTGGTCCATCGGTCATTACA
Second NA segment	CCCCTTGAATGCAGAACCTT
	ATATCGTCTGATTAGTAGACAACAAGGAGTTTTT
M	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGCTAG
	ATATCGTCTGATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT
NS	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG
	ATATCGTCTGATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT

3.3.5 Phylogenetic and Molecular Analysis

DNA sequences were edited using the Lasergene sequence analysis software (DNASTAR, Madison, Wisconsin) for every gene sequence. Multiple alignment and phylogenetic trees were performed using MEGA7 software, applying neighbor-joining (NJ) method with 1.000 bootstrap replicates and Kimura 2-parameter. This method was chosen based on the large amount of data used and considering high variability and evolution rates associated with influenza viruses. Available sequences in GenBank were chosen to perform phylogenetic analysis from the main influenza lineages, such as Classical swine, Eurasian Avian-like, North America triple reassortant, human origin influenza virus, and 2009 H1N1 pandemic strains (and reassorting strains) reported in North America, South America, Europe and Asia. Colombian swine influenza virus strain sequences available from 2008-2009 were included in the phylogenetic analysis.

Molecular similarities were described for each gene using MegAlign software performing Clustal W pairwise alignment algorithm to make comparisons with reference strains and viral isolate sequences from this study.

3.4 Results

The molecular detection of Influenza A virus was accomplished using samples collected in clinically normal pigs at the slaughterhouse. The virus was present in 5 out of the 11 regions analyzed (Cundinamarca, Eje Cafetero, Antioquia, Valle del Cauca and Meta) during the exploratory study, as well as during the second and third period of sampling (shown in table 3-4 and table 3-5). According to the results described in tables 3-6, a higher percentage of positive samples was found in the regions of Meta (30.9%), Cundinamarca (25.9%) and Eje Cafetero (18.7%), throughout the study, where 21.4% of the Colombian pig population is concentrated. A total of 116 positive samples out of 788 were obtained as a result of this study, which corresponds to 14.7% of detection. Thirteen of these samples were of the H1 subtype, equivalent to 11.2% of the viruses detected. Further subtyping analysis by qRT-PCR identified 2009 H1N1 pandemic influenza virus in two samples collected from pigs in Antioquia and in one sample collected in Cundinamarca, proving that this strain still circulates in the swine population in Colombia ever since it was isolated for the first time in 2009-2010.

Table 3-4: Distribution of samples and results of influenza A detection during the exploratory phase

Region	Positive/total samples	Percentage	H1N1pdm09
Cundinamarca	14/80	17.5%	1
Eje Cafetero	3/20	15%	0
Antioquia	23/125	18.4%	2
Valle del Cauca	3/54	5.5%	0
Meta	1/10	10%	0
Tolima	0/10	-	-
Chocó	0/10	-	-
Huila	0/10	-	-
Santander	0/10	-	-
Atlántico	0/20	-	-
Nariño	0/20	-	-
Total	44/369	11.9%	3

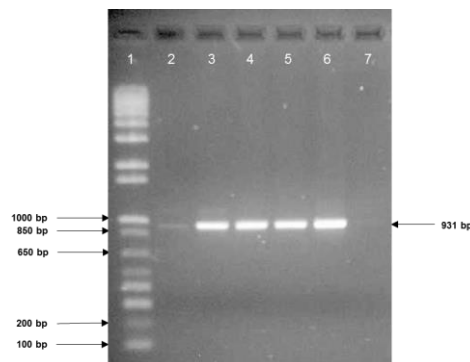
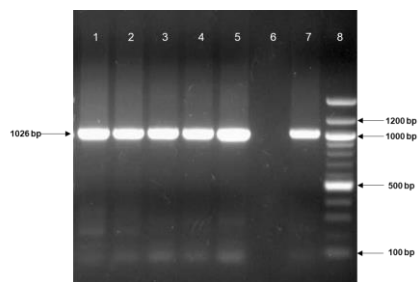
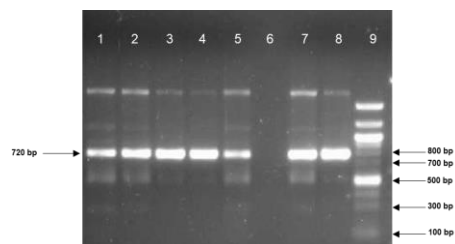
Table 3-5: Results of influenza A virus detection during second and third phases

	Second phase			Third phase		
Region	Positive/total samples	Percentage	H1 subtype	Positive/total samples	Percentage	H1 subtype
Cundinamarca	10/41	24.3%	2	15/33	48.4%	6
Eje Cafetero	8/23	34.7%	1	1/21	4.7%	0
Antioquia	15/108	13.8%	2	5/106	4.7%	0
Valle del Cauca	2/26	7.6%	1	3/29	10.3%	0
Meta	2/18	11.1%	0	10/14	71.4%	1
Total	37/216	17.1%	6	35/203	15.6%	7

Table 3-6: Molecular detection of influenza A virus by geographic regions

Regions	Positive samples	Percentage
Cundinamarca	40/154	25.9%
Eje Cafetero	12/64	18.7%
Antioquia	43/339	12.6%
Valle del Cauca	8/109	7.3%
Meta	13/42	30.9%
Total	116/788	14.7%

Five different virus isolates were obtained after inoculation into chicken embryo eggs. One isolate was recovered from pigs from Cundinamarca (A/swine/Colombia/1-019/2015), while the other four isolates (A/swine/Colombia/3-015/2015 A/swine/Colombia/3-020/2015, A/swine/Colombia/3-021/2015, A/swine/Colombia/3-027/2015) were from pig samples from three different farms in Antioquia. Subtyping analysis by qRT-PCR established that all viruses had molecular traits related to the H1N1pdm09 influenza virus. Full length amplification of HA, NA, M and NS genes of those viruses was accomplished in order to perform sequencing and further analysis (Figures 3-1 to 3-6).

Figure 3-1: Amplification of HA gene first segment²²**Figure 3-2:** Amplification of HA gene second segment²³**Figure 3-3:** Amplification of NA gene first segment²⁴

²² RT-PCR products of HA gene first segment, amplification product of 931 bp. Lane 1: 100 bp DNA size marker. Lanes 2-6: positive influenza virus isolates. Lane 7: negative control

²³ RT-PCR products of HA gene second segment, amplification product of 1026 bp. Lane 9: 100 bp DNA size marker. Lanes 1-5: positive influenza virus isolates. Lane 6: negative control. Lanes 7-8: positive controls

²⁴ RT-PCR products of NA gene first segment, amplification product of 720 bp. Lane 9: 100 bp DNA size marker. Lanes 1-5: positive influenza virus isolates. Lane 6: negative control. Lanes 7-8: positive controls

Figure 3-4: Amplification of NA gene second segment²⁵

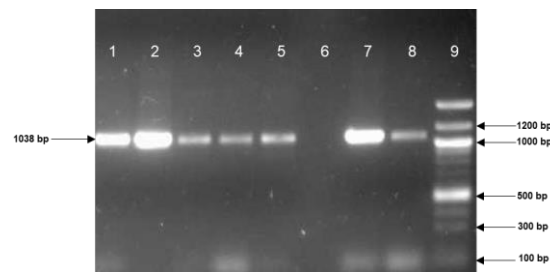


Figure 3-5: Amplification of M gene²⁶

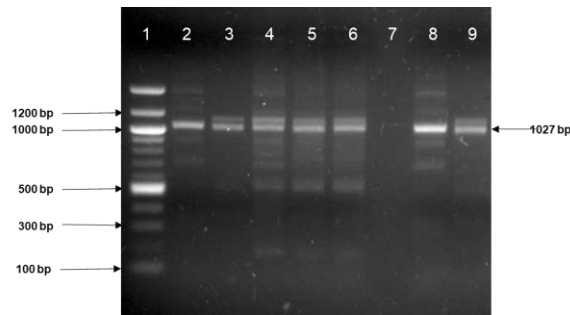
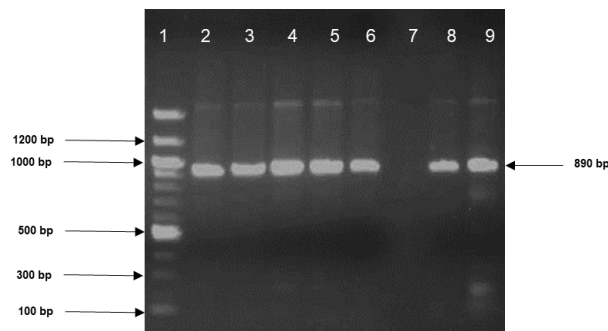


Figure 3-6: Amplification of NS gene²⁷



²⁵ RT-PCR products of NA gene second, amplification product of 1038 bp. Lane 9: 100 bp DNA size marker. Lanes 1-5: positive influenza virus isolates. Lane 6: negative control. Lanes 7-8: positive controls

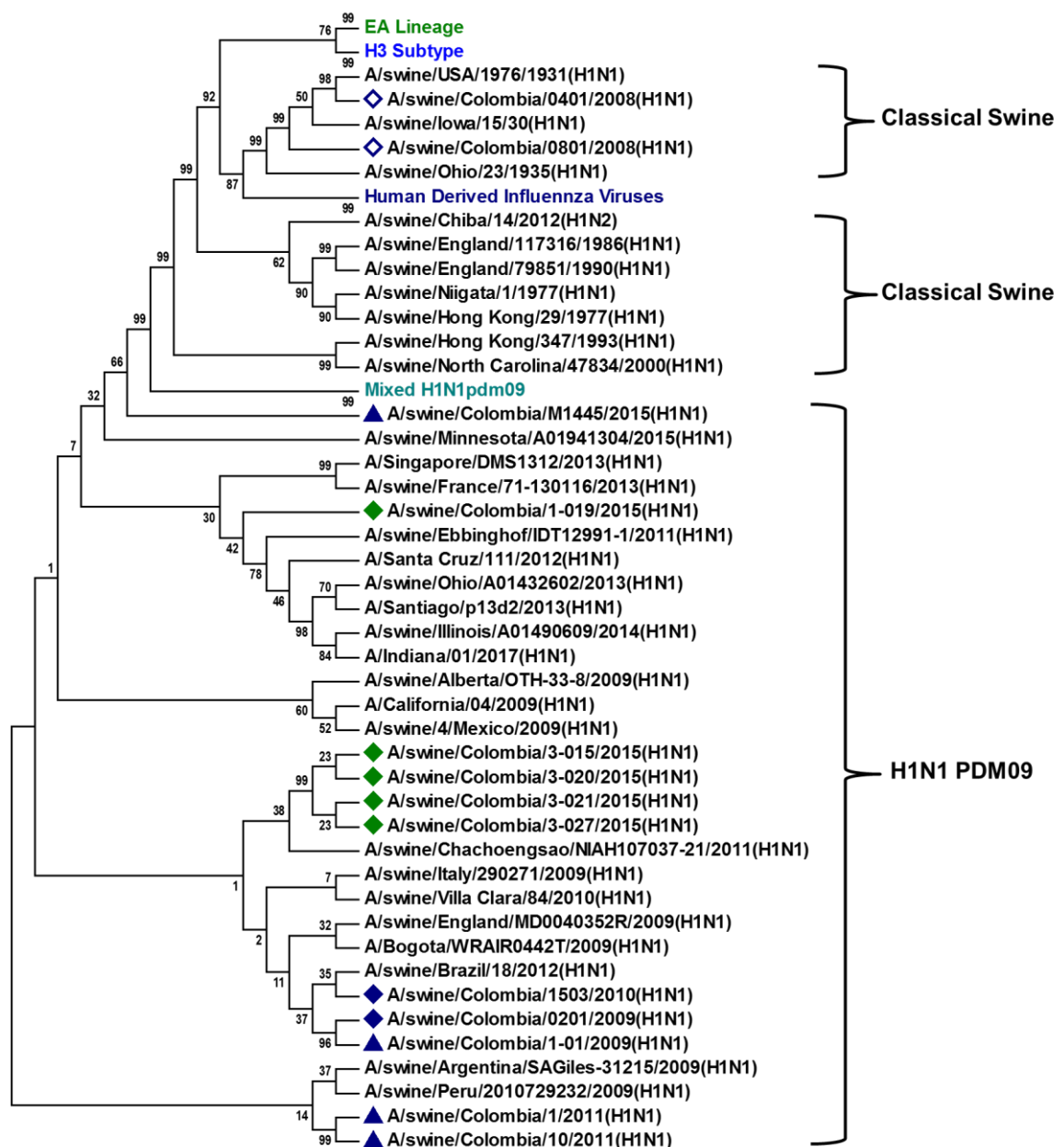
²⁶ RT-PCR products of M gene, amplification product of 1027 bp. Lane 1: 100 bp DNA size marker. Lanes 2-6: positive influenza virus isolates. Lane 7: negative control. Lanes 8-9: positive controls

²⁷ RT-PCR products of NS gene, amplification product of 890 bp. Lane 1: 100 bp DNA size marker. Lanes 2-6: positive influenza virus isolates. Lane 7: negative control. Lanes 8-9: positive controls

When performing the Clustal W alignment algorithm to compare the nucleotide sequences of each of the analyzed genes, it was evident that there was a close relation amongst 2009 H1N1 pandemic influenza virus. However, when comparing isolates from Antioquia they were very similar among each other showing a similarity between 99-100%, and comparative analysis with the reference strain (A/California/04/2009) demonstrated an identity percentage close to 98-99% for every gene segment. On the other hand, the Cundinamarca isolate showed divergence when compared to Antioquia isolates as the identity was between 96-97%, and similarity to the reference strain was close to 97-98% for every gene segment in the analysis (Results shown in annex C).

After phylogenic analysis of the HA gene sequences (Figure 3-7) from this study, it was found that Antioquia isolates were placed in the same cluster with close relation between each other and demonstrated a bootstrap value of 99%, but they described a more distant relation to the Cundinamarca isolate which is placed in a different cluster. All of the five isolates were placed in the same clade as H1N1pdm09 strains reported in North America, Europe, Asia, and South America, but the Antioquia isolates showed a close relation to a virus reported in China during 2011 from a swine host (A/swine/Chachoengsao/NIAH107037-21/2011). On the other hand, the Cundinamarca isolate is located in the same cluster along with virus strains reported in Germany (A/swine/Ebbinghof/IDT12991-1/2011) and the United States (A/swine/Ohio/A01432602/2013; A/swine/Illinois/A01490609/2014) from swine hosts, but also to several viruses found in Bolivia (A/Santa Cruz/111/2012), Chile (A/Santiago/p13d2/2013), and the United States (A/Indiana/01/2017) from human hosts. These isolates had a minor relation to H1N1pdm09 viruses previously reported in Colombia during 2009 (A/swine/Colombia/0201/2009 isolated from Antioquia), 2011 (A/swine/Colombia/10/2011; A/swine/Colombia/1/2011 both from Los Llanos) and 2015 (A/swine/Colombia/M1445/2015 from Huila) exhibiting long distances to each other. Moreover, Colombian isolates reported during 2008 (A/swine/Colombia/0401/2008; A/swine/Colombia/0801/2008 both isolated from Antioquia) are described in the classical swine influenza virus clade and do not have close homology with new isolates; but they do share homology with Classical strains from the United States (A/swine/Iowa/15/1930; A/swine/USA/1976/1931; A/swine/Ohio/23/1935).

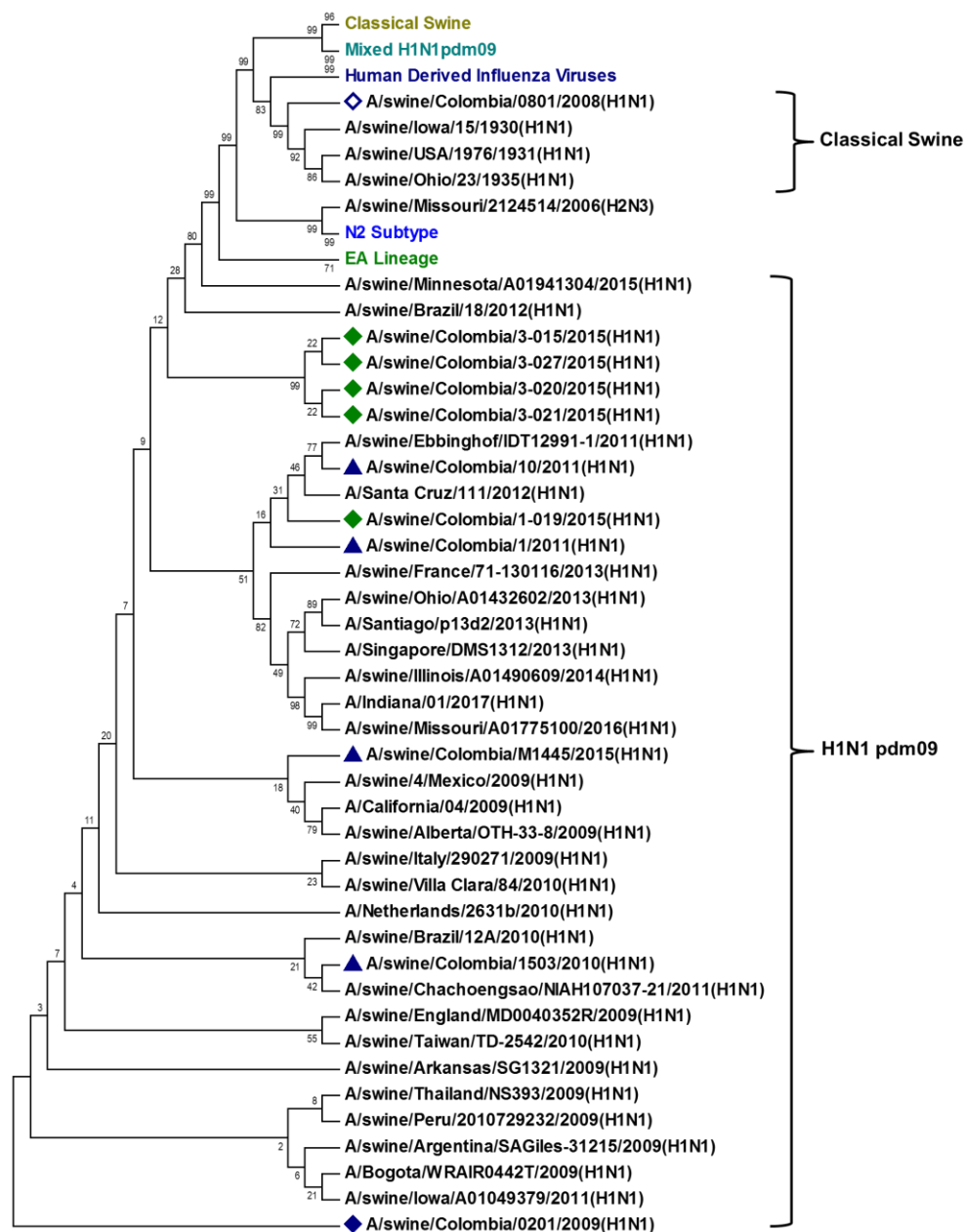
Figure 3-7: Phylogenetic analysis for HA gene²⁸



²⁸ Phylogenetic tree of HA gene generated by the neighbor-joining method using MEGA7 software. The reliability of the trees was inferred by bootstrap analysis with 1.000 replications and Kimura 2-parameter. The tree was constructed with representative sequences from EA, classical swine, H3, seasonal human H1N1 and H1N1pdm09 (including mixed strains) influenza viruses. Isolates from this study are labeled with green diamond bullets

When comparing NA gene sequences from viruses recovered in this study, it is evident that there is a very close relation of the Antioquia isolates placed in a common cluster that describes a bootstrap value of 99%, which is independent from the Cundinamarca isolate cluster. All five isolates are included in a common pandemic clade alongside with H1N1pdm09 strains from Europe, Asia, North America and South America as shown in Figure 3-8. The Antioquia strains do not share a cluster with other viruses in the phylogenic analysis, but the Cundinamarca isolate forms a cluster alongside to strains reported in Germany (A/swine/Ebbinghof/IDT12991-1/2011), France (A/swine/France/71-130116/2013), and The United States (A/swine/Ohio/A01432602/2013; A/swine/Illinois/A01490609/2014; A/swine/Missouri/A01775100/2016) from swine hosts, but also to several strains isolated in Bolivia (A/Santa Cruz/111/2012), Chile (A/Santiago/p13d2/2013), Singapore (A/Singapore/DMS1312/2013) and The United States (A/Indiana/01/2017) from human hosts. In the same cluster, a close relation can be described between the Cundinamarca isolate and H1N1pdm09 strains reported in Colombia during 2011 (A/swine/Colombia/10/2011, A/swine/Colombia/1/2011) in the region Los Llanos. Although other pandemic Colombian viruses isolated during 2009 (A/swine/Colombia/0201/2009 from Antioquia), 2010 (A/swine/Colombia/1503/2010 from Cundinamarca) and 2015 (A/swine/Colombia/M1445/2015 reported from Huila) are placed in the same H1N1pdm09 clade, they describe a higher degree of divergence compared to virus strains obtained in this study as there is a representative distance between them. On the other hand, the Colombian strain A/swine/Colombia/0801/2008, isolated during 2008 is closely related to other influenza viruses in the classical swine lineage reported in the United States (A/swine/Iowa/15/1930; A/swine/USA/1976/1931; A/swine/Ohio/23/1935).

Figure 3-8: Phylogenetic analysis for NA gene²⁹

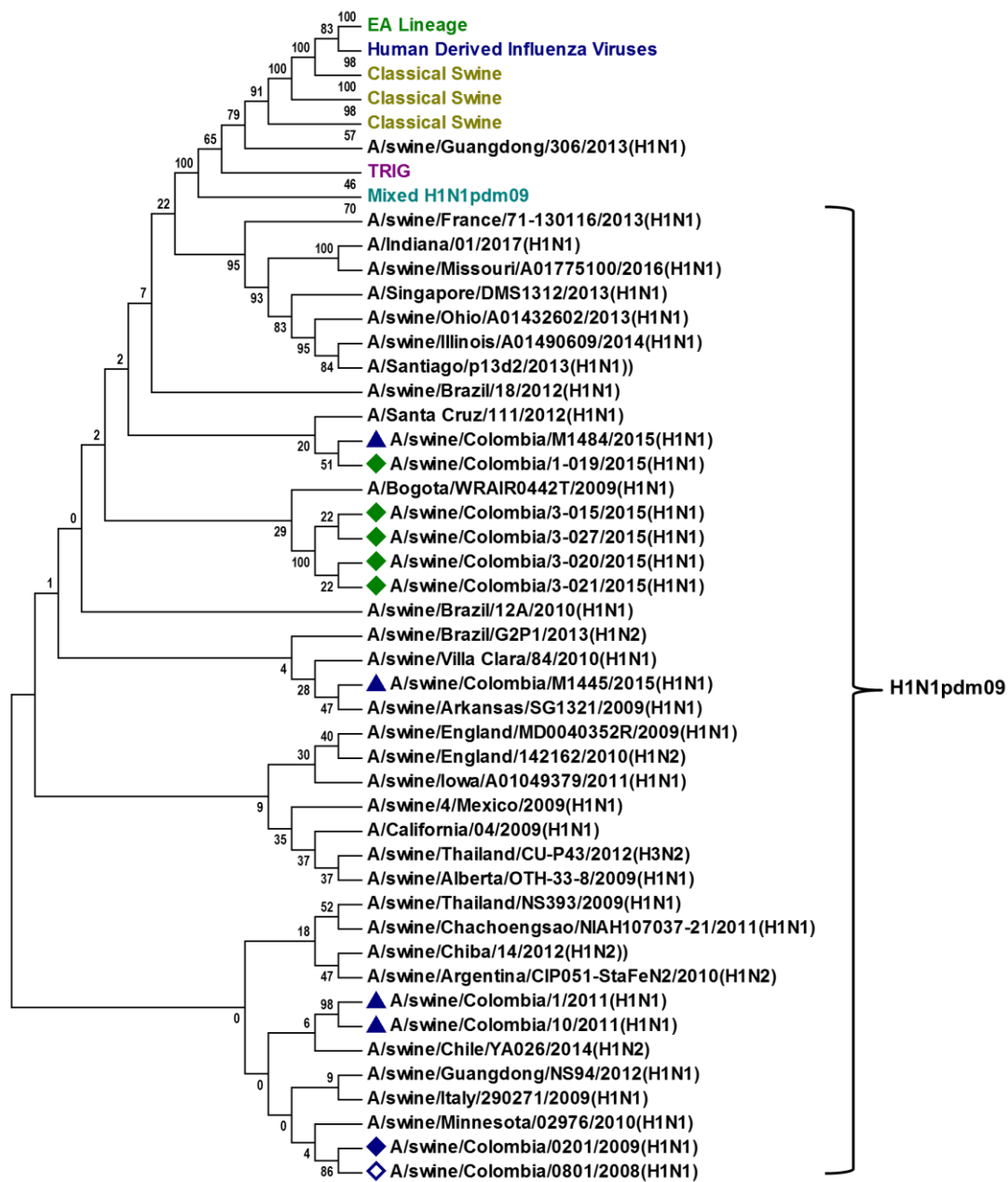


²⁹ Phylogenetic tree of the NA gene generated by the neighbor-joining method using MEGA7 software. The reliability of the trees was inferred by bootstrap analysis with 1.000 replications and Kimura 2-parameter. The tree was constructed with representative sequences from EA, classical swine, H3, seasonal human H1N1 and H1N1pdm09 (including mixed strains) influenza viruses. Isolates from this study are labeled with green diamond bullets

Phylogeny of M genes (Figure 3-9) demonstrates once again that Antioquia isolates are very similar between each other with 99 percentage of bootstrapping at the same cluster, which can be described aside from the Cundinamarca isolate cluster, this also shows a substantial distance between these two groups. Analysis of M gene sequences relates the five virus isolates recovered during this study to H1N1pdm09 genes detected around the world from human and swine hosts. For the Antioquia isolates, it can be seen that they are related to several viruses detected in Brazil (A/swine/Brazil/18/2012), China (A/swine/Chachoengsao/NIAH107037-21/2011), Mexico (A/swine/4/Mexico/2009) and Canada (A/swine/Alberta/OTH-33-8/2009) from pig hosts, as well as to the reference strain (A/California/04/2009) reported in the United States during the 2009 pandemic event from a human host. However, the Cundinamarca isolate seems to be related to additional strains reported in China (A/swine/Guangdong/306/2011), the United States (A/swine/Missouri/A01203163/2012; A/swine/Ohio/A01432602/2013; A/swine/Illinois/A01490609/2014; A/swine/Missouri/A01775100/2016) and France (A/swine/France/71-130116/2013) from swine hosts, but also to various strains isolated in Bolivia (A/Santa Cruz/111/2012), Chile (A/Santiago/p13d2/2013), Singapore (A/Singapore/DMS1312/2013) and the United States (A/Indiana/01/2017) from human hosts. The Cundinamarca virus also shares a common cluster with other swine influenza virus isolates from Colombia, reported during 2011 (A/swine/Colombia/10/2011; A/swine/Colombia/1/2011 from Los Llanos) and 2015 (A/swine/Colombia/M1445/2015; A/swine/Colombia/M1484/2015, both from Huila). According to these findings, the matrix gene for the five isolates from this survey shows no relation to classical swine strains or any other lineage. Nevertheless, the A/swine/Colombia/0401/2008 virus strain (detected during 2008 in Antioquia), which was related in the first place to the classical swine lineage according to its HA gene as a result of the phylogenetic analysis, now seems to be related to the H1N1pdm09 clade, also demonstrating a close relation with the A/swine/Colombia/0201/2009 pandemic strain isolated during 2009 from the same region.

Regarding the NS gene sequences of the virus strains isolated in this study, it can be said that the Antioquia isolates show a close relation between the four of them, representing an independent cluster with a bootstrapping value of 100%. Nevertheless, the Cundinamarca strain is located in a different cluster demonstrating a considerable nucleotide sequence divergence. Phylogenic analysis demonstrates that the NS gene for all Colombian isolates collected during this research belong to the H1N1pdm09 clade (Figure 3-10). For the Antioquia isolates, they are placed at the same cluster as an H1N1pdm09 virus isolated from a human host in Colombia during 2009 (A/Bogota/WRAIR0442T/2009), also a lower degree of relation seems to exist within these strains and a virus isolated in Brazil during 2010 from a swine host (A/swine/Brazil/12A/2010). On the other hand, the Cundinamarca virus belongs to the same cluster as the swine influenza virus circulating in Colombia during 2015 (A/swine/Colombia/M1484/2015 from Huila), as well as an influenza strain detected in Bolivia from a human host (A/Santa Cruz/111/2012). Other strains reported in Colombia during 2009 (A/swine/Colombia/0201/2009 from Antioquia), in 2011 (A/swine/Colombia/10/2011; A/swine/Colombia/1/2011, both from Los Llanos) and in 2015 (A/swine/Colombia/M1445/2015, isolated from Huila) are placed in the H1N1pdm09 clade, but show a different relation with the virus strains isolated during this study. The results derived from this analysis demonstrate that the NS gene for the strains in this survey do not have homology to any other lineage like swine classical, Eurasian (EA) or triple-reassortant swine influenza virus. However, when considering the results of the phylogenic analysis of the HA and the NA genes for a virus strain reported in Colombia during 2008, (A/swine/Colombia/0801/2008 isolated from Antioquia) it is clear that the NS gene of this virus belongs to the H1N1pdm09 clade, despite of it being associated to the swine classical lineage. In addition, the same strain shares a common cluster alongside with another strain isolated in Colombia during 2009 (A/swine/Colombia/0201/2009 also from Antioquia).

Figure 3-10: Phylogenetic analysis for NS gene³¹



³¹ Phylogenetic tree of the NS gene generated by the neighbor-joining method using MEGA7 software. The reliability of the trees was inferred by bootstrap analysis with 1.000 replications and Kimura 2-parameter. The tree was constructed with representative sequences from EA, classical swine, H3, seasonal human H1N1 and H1N1pdm09 (including mixed strains) influenza viruses. Isolates from this study are labeled with green diamond bullets

3.5 Discussion

The detection and isolation of H1N1pdm09 strains proves its continuous presence throughout the pig population in Colombia since 2009 when the virus appeared and was isolated in the country for the first time. Thus, describing a major presence when comparing it to the classical H1N1 and H3N2 swine influenza viruses which were circulating previously within the Colombian swine population for over thirty years. Evidence of this fact is the isolation of the classical H1N1 swine influenza virus from samples collected in 2008, before the H1N1pdm09 virus appeared and infected pigs in Colombia (Ramirez-Nieto, 2012). However, phylogenetic analysis of the internal genes from viruses isolated in our country in 2008 shows evidence that reassortment events were happening before 2009. This was due to the fact that phylogenetic analysis of the NS gene from A/swine/Colombia/0801/2008, and the M gene from A/swine/Colombia/0401/2008 both belong to the classical lineage according to their surface glycoproteins but were associated with genes corresponding to those in the H1N1pdm09 influenza virus conformation.

It is important to emphasize that after 2008, swine influenza viruses of the classical lineage have not been detected and molecular evidence for swine H3N2 subtype is still missing, which might be the result of a major level of adaptation for H1N1pdm09 strains within the pig population in Colombia as it has been established in other publications (Sakabe et al., 2011; Wörmann et al., 2016). There should be an initiative to carry out new studies that could describe the existence of molecular advantages for this virus that resulted in an increased level of fitness over the other strains. Although vaccination programs are not in place in the Colombian swine population, it is clear that influenza viruses continue evolving and suffering molecular changes, which may be caused by the circulation and repeated introductions of H1N1pdm09 virus. This puts into perspective the need for research of the adaptations or the evolutionary advantages expressed by the influenza viruses circulating in the Colombian swine population. In this sense, genetic changes driven by antigenic drift that emerged in Colombian strains have to be analyzed in order to establish additional factors contributing to the evolution of this agent. For example, the existence of a regional relation that differentiates isolates from Antioquia

and Cundinamarca, as shown in the phylogenic analysis, that can be a consequence of geographical barriers that restrict national circulation of a particular strain.

In general terms, pigs have been considered a threat for human health due to their role as "mixing vessel" from which new viruses could emerge. Nevertheless, nowadays it is known that humans could also play this role and therefore could be considered responsible for the transmission of influenza viruses into pigs and could have an effect at a lineage level of influenza viruses, creating a way into the emergence of new viruses with a potential pandemic risk. Phylogenic relation between Colombian swine isolates and some human influenza viruses make transmission events between these two species evident. This, in turn, supports the effect of human influenza strains that introduce new components to influenza viruses into swine species, as it has been shown in other studies (Gramer, 2012; Nelson et al., 2012; Zhu et al., 2015). Then, it should be considered as a call for increasing prevention and decreasing transmission risk during every stage where human contact is presumable (from farm production facilities to slaughterhouse centers). Human interaction is a major factor for the evolution of swine influenza strains because it introduces human origin viruses into the swine species. Once established in this non-natural host, these strains may eventually mutate to acquire new molecular traits that might allow a reverse infection to human hosts, thus determining a major epidemiological relevance.

It is worth mentioning that the sampling strategy employed in slaughterhouse pigs in this study has shown to be effective for influenza virus molecular detection and virus isolation and proved to be useful for screening analysis in finishing pigs, coinciding with the usefulness described in previous investigations around the world (Zhu et al., 2011; Qi et al., 2012; Fan et al., 2012; Chen et al., 2013; Pascua et al., 2013; Qiao et al., 2014; Lee et al., 2015). This proves that this strategy could be used in order to acquire valuable information to monitor influenza virus at a national level in Colombia. Although we can miss information of animals from other stages at the farm, slaughterhouse facilities provide access to a broad range of animals, which come from different locations across the country and from different farm conditions. As a result, this allows researchers to understand regional situations that can contribute to the knowledge of the current situation at a national level.

Tracing influenza viruses through slaughterhouse pigs allows to assume that influenza virus infections are occurring permanently at farms and they remain present in finishing pigs without evidence of clinical disease. This suggests a subclinical condition that needs to be investigated for the implementation of control measures. These findings coincide with other investigations (Bowman et al., 2012; Dagan et al., 2014; Takemae et al., 2016) and have to be analyzed in order to develop new studies which help to identify risk factors that allow for the maintenance of subclinical infections along the production chain that might result in the sustained circulation of the virus within the farm.

The results presented provide a perspective of the general context of Colombia in relation to the circulation of influenza virus in commercial pig farms. The strategy could be used as a model to perform a thorough survey that provides epidemiological insight into swine influenza virus status at a national as well as a farm level in Colombia. This strategy, that not only allowed the detection, but also made it possible to isolate field influenza virus strains from different regions, acquires major importance because it allows researchers to characterize multiple viruses from different origins. This, in turn, would also be useful for determining molecular and antigenic features which need to be considered for decision making and establishment of control measures according to the real situation of influenza virus dynamics and the characteristics of the swine industry in our country. This decision must be taken into consideration as a mitigation mechanism when a major pandemic or outbreak arrives.

3.6 Conclusions

Swine influenza virus can be considered a prevalent infectious agent in Colombian pigs, as it has been shown in previous investigations, and it is involved in infections that contribute to the respiratory complex syndrome. First, research performed in Colombia allowed to distinguish classic H1N1 and H3N2 as the major subtypes present in this population (Cucaita, 2005; Hanssen et al., 1977; Mogollon et al., 2003; Moscoso & Neira, 2001). Nowadays, it is also known that ever since its appearance in the swine population in our country, the pandemic H1N1 influenza virus has become the most predominant

according to molecular detection. High mutation and reassortment event rates are favored and commonly associated with this specific pandemic strain and its presence in the pig population should be considered a call for increasing epidemiologic research in preventing forthcoming outbreaks.

Accomplishing molecular detection of swine influenza virus proves the continuing circulation of these viruses throughout the Colombian pig population, remarkably important in the three major producing areas (Cundinamarca, Valle y Antioquia) where their presence is confirmed once again (Karlsson et al., 2013; Ramirez-Nieto, 2012). The results presented here prove the continuing circulation of H1N1 2009 pandemic strains within swine population in Colombia, established through molecular detection and virus isolation. Phylogenetic studies have proved pandemic origin for all genes analyzed so far, relating to strains reported in South America, United States, Asia, and Europe from swine and human origin. Based on unpublished results, it could be said that reassortment events have happened among endemic and pandemic strains, considering that NS and M genes from 2008 Colombian isolates were related to pandemic viruses, but the external genes were related to classical swine influenza viruses. Four isolates found in Antioquia were closely related between each other in each of the four gene segments analyzed, but the Cundinamarca isolate showed a higher divergence from the Antioquia isolates, suggesting an independent pathway introduction into swine population. Most recent swine influenza viruses are not very similar to previous isolates from 2008, 2009, 2010 and 2011, which could be a result of the effect of the 2009 pandemic strains which are constantly transmitted into swine population resulting in new changes and evolution pathways. Considering that molecular variation mechanisms are a way in which new viruses emerge, research of swine influenza viruses needs to continue in order to identify and characterize new strains that might become a global health concern.

References

- Air, G. M. (2015). Influenza virus antigenicity and broadly neutralizing epitopes. *Current Opinion in Virology*, 11, 113–121. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.03.006>
- Bowman, A. S., Nolting, J. M., Nelson, S. W., & Slemons, R. D. (2012). Subclinical influenza virus A infections in pigs exhibited at agricultural fairs, Ohio, USA, 2009–2011. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12), 1945–1950. <http://doi.org/10.3201/eid1812.121116>
- Brown, I. H. (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*, 74(1–2), 29–46. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00164-4](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00164-4)
- Chen, Y., Zhang, J., Qiao, C., Yang, H., Zhang, Y., Xin, X., & Chen, H. (2013). Co-circulation of pandemic 2009 H1N1, classical swine H1N1 and avian-like swine H1N1 influenza viruses in pigs in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 13, 331–338. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.09.021>
- Crisci, E., Mussá, T., Fraile, L., & Montoya, M. (2013). Review: Influenza virus in pigs. *Molecular Immunology*, 55(3–4), 200–211. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.02.008>
- Cucaita, A. (2005). *Estudio comparativo de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI) y la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos frente al virus de la influenza porcina*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Dagan, B., Services, F. V., Health, A., Dagan, B., Consultant, V. P., Health, A., & Agency-weybridge, V. L. (2014). Seroepidemiology Survey and Isolation of Swine Influenza Viruses from Subclinical Infections in Israel During the Years 2009–2011. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 69(2), 62–67.
- Dangi, T., & Jain, A. (2012). Influenza Virus: A Brief Overview. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 82(1), 111–121. <http://doi.org/10.1007/s40011-011-0009-6>
- Fan, X., Zhu, H., Zhou, B., Smith, D. K., Chen, X., Lam, T. T.-Y., Guan, Y. (2012). Emergence and dissemination of a swine H3N2 reassortant influenza virus with 2009 pandemic H1N1 genes in pigs in China. *Journal of Virology*, 86(4), 2375–8. <http://doi.org/10.1128/JVI.06824-11>
- Fiers, W., Fang, R.-X., Min Jou, W., Huylebroeck, D., Verhoeyen, M., Devos, R., & Van Rempuy, L. (1981). Drift and Shift of Influenza Virus Studied At the Genomic Level. *Genetic Variation Among Influenza Viruses*, 17–27. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-515080-4.50007-9>
- Gerber, M., Isel, C., Moules, V., & Marquet, R. (2014). Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends in Microbiology*, 22(8), 446–455. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.001>
- Gramer, M. (2012). Transmission of Influenza A Virus in Pigs, 59, 68–84.

- <http://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01300.x>
- Greenbaum, B. D., & Ghedin, E. (2015). Viral evolution: beyond drift and shift. *Current Opinion in Microbiology*, 26(April), 109–115. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.015>
- Greenbaum, B. D., Li, O., Poon, L., Levine, A., & Rabadan, R. (2015). Viral reassortment as an information exchange between viral segments, 109(9), 3341–3346. <http://doi.org/10.1073/pnas.11>
- Hanssen, H., Hincapié, O., & López, J. (1977). Influenza en porcinos de Antioquia, Colombia. *Pan American Journal of Public Health*, 82(1).
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Brecher, M., White, J. M., & Steven, A. C. (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19123–19127. <http://doi.org/10.1073/pnas.0607614103>
- Instituto Colombiano Agropecuario, (I. C. A) (2016). Censo Pecuario Nacional-2016. Retrieved from www.ica.gov.co
- Ito, T., & Kawaoka, Y. (2000). Host-range barrier of influenza A viruses. *Veterinary Microbiology*, 74(2000), 71–75. [http://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00167-X](http://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00167-X)
- Karlsson, E. a, Ciudoderis, K., Freiden, P. J., Seufzer, B., Jones, J. C., Johnson, J., Schultz-Cherry, S. (2013). Prevalence and characterization of influenza viruses in diverse species in Los Llanos, Colombia. *Emerging Microbes & Infections*, 2(4), e20. <http://doi.org/10.1038/emi.2013.20>
- Kong, W., Wang, F., Dong, B., Ou, C., Meng, D., Liu, J., & Fan, Z.-C. (2015). Novel reassortant influenza viruses between pandemic (H1N1) 2009 and other influenza viruses pose a risk to public health. *Microbial Pathogenesis*, 89, 62–72. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.002>
- Lee, J. H., Pascua, P. N. Q., Decano, A. G., Kim, S. M., Park, S.-J., Kwon, H.-I., Choi, Y. K. (2015). Evaluation of the zoonotic potential of a novel reassortant H1N2 swine influenza virus with gene constellation derived from multiple viral sources. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 378–393. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.06.005>
- Lyoo, K.-S., Kim, J.-K., Jung, K., Kang, B.-K., & Song, D. (2014). Comparative pathology of pigs infected with Korean H1N1, H1N2, or H3N2 swine influenza A viruses. *Virology Journal*, 11(1), 170. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-11-170>
- Ma, W., Kahn, R. E., & Richt, J. a. (2008). The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *Journal of Molecular and Genetic Medicine : An International Journal of Biomedical Research*, 3(1), 158–166.
- Mancipe Jiménez, L. F., Ramírez Nieto, G., Vera Alfonso, V., & Jaime Correa, J. (2014). Association of swine influenza H1N1 pandemic virus (SIV-H1N1p) with porcine respiratory disease complex in sows from commercial pig farms in Colombia. *Virologica Sinica*, 29(4), 242–249. <http://doi.org/10.1007/s12250-014-3471-5>

- Mehle, A., Dugan, V. G., Taubenberger, J. K., & Doudna, J. A. (2012). Reassortment and Mutation of the Avian Influenza Virus Polymerase PA Subunit Overcome Species Barriers. *Journal of Virology*, 86(3), 1750–1757. <http://doi.org/10.1128/JVI.06203-11>
- Mogollon, J., Rincón, M., Preciado, P., Cepeda, M., & S., R. (2003). Reactividad serológica frente al virus de la influenza porcina en explotaciones intensivas de Colombia. *Referencias Para Consultorios MV (Bogotá)*, (6), 15–20.
- Moscoso, C., & Neira, G. (2001). *Prevalencia de reactores al virus de influenza porcina H3N2 en granjas de explotación intensiva en el país*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Munster, V. J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., Fouchier, R. A. M. (2007). Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLoS Pathogens*, 3(5), e61. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030061>
- Nelson, M. I., Gramer, M. R., Vincent, A. L., & Holmes, E. C. (2012). Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *Journal of General Virology*, 93(Pt_10), 2195–2203. <http://doi.org/10.1099/vir.0.044974-0>
- Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2015). Transmission of influenza A viruses. *Virology*, 479–480C, 234–246. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.009>
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2006). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, 312(5772), 384–388. <http://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Pascua, P. N. Q., Lim, G. J., Kwon, H. II, Park, S. J., Kim, E. H., Song, M. S., Choi, Y. K. (2013). Emergence of H3N2pM-like and novel reassortant H3N1 swine viruses possessing segments derived from the A (H1N1)pdm09 influenza virus, Korea. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7, 1283–1291. <http://doi.org/10.1111/irv.12154>
- Prevention, C. for D. C. and. (2009). Swine Influenza. In *CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1)* (pp. 1–7).
- Qi, X., Pan, Y., Qin, Y., Zu, R., Tang, F., Zhou, M., Song, Y. (2012). Molecular characterization of avian-like H1N1 swine influenza a viruses isolated in Eastern China, 2011. *Virologica Sinica*, 27(5), 292–8. <http://doi.org/10.1007/s12250-012-3262-9>
- Qiao, C., Liu, L., Yang, H., Chen, Y., Xu, H., & Chen, H. (2014). Novel triple reassortant H1N2 influenza viruses bearing six internal genes of the pandemic 2009/H1N1 influenza virus were detected in pigs in China. *Journal of Clinical Virology*, 61(4), 529–534. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.10.014>
- Qu, Y., Zhang, R., Cui, P., Song, G., Duan, Z., & Lei, F. (2011). Evolutionary genomics of the pandemic 2009 H1N1 influenza viruses (pH1N1 1v). *Virology Journal*, 8(1), 250. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-250>
- Ramirez-Nieto, G. C. (2012). First isolation and identification of H1N1 swine influenza

- viruses in Colombian pig farms. *Health*, 4(10), 983–990.
<http://doi.org/10.4236/health.2012.430150>
- Sakabe, S., Ozawa, M., Takano, R., Iwastuki-Horimoto, K., & Kawaoka, Y. (2011). Mutations in PA, NP, and HA of a pandemic (H1N1) 2009 influenza virus contribute to its adaptation to mice. *Virus Research*, 158(1–2), 124–129.
<http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.022>
- Scholtissek, C. (1994). Source for Influenza Pandemics. *European Journal of Epidemiology*, 10(4), 456–458.
- Shaw, M. L., & Palese, P. (2013). Orthomyxoviridae. In D. Knipe & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 1151–1185). Philadelphia, USA, USA: Wolter Kuwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Smith, G. J. D., Bahl, J., Vijaykrishna, D., Zhang, J., Poon, L. L. M., Chen, H., Guan, Y. (2009). Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28), 11709–12.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0904991106>
- Suzuki, T., Horiike, G., Yamazaki, Y., Kawabe, K., Masuda, H., Miyamoto, D., Suzuki, Y. (1997). Swine influenza virus strains recognize sialylsugar chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *FEBS Letters*, 404(2–3), 192–196. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00127-0](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00127-0)
- Takemae, N., Shobugawa, Y., Nguyen, P. T., Nguyen, T., Nguyen, T. N., To, T. L., Saito, T. (2016). Effect of herd size on subclinical infection of swine in Vietnam with influenza A viruses. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 227.
<http://doi.org/10.1186/s12917-016-0844-z>
- Vijaykrishna, D., Poon, L. L. M., Zhu, H. C., Ma, S. K., Li, O. T. W., Cheung, C. L., Guan, Y. (2010). Reassortment of Pandemic H1N1/2009 Influenza A Virus in Swine. *Science*, 328(5985), 1529–1529. <http://doi.org/10.1126/science.1189132>
- Wang, J.-Y., Chen, Z.-L., Li, C.-S., Cao, X., Wang, R., Tang, C., Liu, H.-J. (2015). The distribution of sialic acid receptors of avian influenza virus in the reproductive tract of laying hens. *Molecular and Cellular Probes*, 29(2), 129–134.
<http://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.01.002>
- Webster, R. G. (1998). Influenza: An emerging disease. *Emerging Infectious Diseases*, 4(3), 436–441. <http://doi.org/10.3201/eid0403.980325>
- Wörmann, X., Lesch, M., Welke, R.-W., Okonechnikov, K., Abdurishid, M., Sieben, C., Karlas, A. (2016). Genetic characterization of an adapted pandemic 2009 H1N1 influenza virus that reveals improved replication rates in human lung epithelial cells. *Virology*, 492, 118–129. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2016.02.002>
- Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., & Gao, G. F. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*, 22(4), 183–191.
<http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.010>

-
- Yoon, S.-W., Webby, R., & Webster, R. G. (2014). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. In R. W. Compans & M. Oldstone (Eds.), *Current Topics in Microbiology and immunology Influenza Pathogenesis and Control-Volume I* (Volume 385, pp. 359–370). Switzerland: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-1115-1>
- Zhang, X.-S., De Angelis, D., White, P. J., Charlett, A., Pebody, R. G., & McCauley, J. (2013). Co-circulation of influenza A virus strains and emergence of pandemic via reassortment: the role of cross-immunity. *Epidemics*, 5(1), 20–33. <http://doi.org/10.1016/j.epidem.2012.10.003>
- Zhu, H., Zhou, B., Fan, X., Lam, T. T. Y., Wang, J., Chen, a., Guan, Y. (2011). Novel Reassortment of Eurasian Avian-Like and Pandemic/2009 Influenza Viruses in Swine: Infectious Potential for Humans. *Journal of Virology*, 85(20), 10432–10439. <http://doi.org/10.1128/JVI.05352-11>
- Zhu, W., Yang, S., Dong, L., Yang, L., Tang, J., Zou, X., Shu, Y. (2015). The repeated introduction of the H3N2 virus from human to swine during 1979–1993 in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 20–24. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.001>

4. Discusión, conclusiones y recomendaciones

4.1 Discusión

La detección y aislamiento de la cepa H1N1pdm09 demuestra la presencia continua de este virus en la población de cerdos de Colombia desde su surgimiento y diseminación durante la pandemia de 2009, sugiriendo una predominancia reflejada en los hallazgos encontrados en cerdos al sacrificio en Colombia, si lo comparamos con otros virus de los subtipos H1N1 clásico y H3N2 porcinos, que circularon en la población de cerdos de Colombia por más de 30 años y no pudieron ser detectados durante el desarrollo de este estudio. Lo anterior se basa también en resultados que muestran que a partir de muestras tomadas durante 2008, antes que la cepa H1N1pdm09 surgiera e infectara a los cerdos en Colombia, se obtuvieron aislamientos del virus de influenza porcina H1N1 clásico y posterior a esto los aislamientos fueron preferencialmente del tipo H1N1pdm09 (Ramirez-Nieto, 2012). No obstante lo anterior, el análisis filogenético de los genes internos de los aislamientos obtenidos en nuestro país durante 2008 muestra evidencia de eventos de rearreglo que posiblemente ocurrieron en los virus de influenza en cerdos presentes en nuestro país antes de 2009, debido que filogenéticamente las glicoproteínas de superficie se asociaron al linaje de influenza porcina clásico, mientras que el estudio de filogenia del gen NS del virus A/swine/Colombia/0801/2008 y del gen M de la cepa A/swine/Colombia/0401/2008, demostró que se relacionaban con virus de influenza de tipo H1N1pdm09.

Es importante enfatizar que después de 2008 los virus de influenza del linaje clásico no han sido detectados y aún se requiere evidencia molecular para el subtipo H3N2, resultando en la predominancia en la circulación del virus H1N1pdm09, de acuerdo con resultados obtenidos a partir del análisis de muestras de fluido oral en nuestro país. Es necesario por lo tanto determinar si existen ventajas moleculares del virus pandémico del

2009 que sustenten esta hipótesis, lo cual ha sido evidenciado en otras investigaciones (Sakabe et al, 2011; Wörmann et al., 2016). En caso de que no hayan adquirido un mayor nivel de adaptación en comparación con otras cepas, se puede proponer que debido a la ausencia de una respuesta inmunológica específica previa, existía una población susceptible a la infección dentro de las poblaciones porcinas durante los eventos de la pandemia de 2009. Aunque en Colombia no se emplea la vacunación como medida de prevención y por tanto no existe la presión evolutiva ejercida bajo los programas de vacunación en los cerdos, está claro que los virus de influenza continúan evolucionando y pueden sufrir nuevos cambios moleculares, y una vez la cepa H1N1pdm09 fue introducida en los cerdos, es necesario determinar el efecto del ingreso de este nuevo virus en el mantenimiento de la infección en los cerdos. En este sentido, los cambios genéticos derivados del *drift* antigénico deben ser caracterizados en mayor detalle para describir factores adicionales que contribuyan a la evolución de este agente, como puede ser la existencia de relaciones evolutivas regionales como consecuencia de las barreras geográficas que limitan la circulación del virus a lo largo del país, lo cual puede ser una aproximación de los hallazgos obtenidos en el análisis filogenético de los aislamientos colombianos, donde se puede establecer una divergencia entre los virus obtenidos a partir de cerdos de Antioquia y Cundinamarca.

En términos generales, los cerdos podrían ser considerados como una amenaza para la salud humana debido a su papel como “vaso mezclador” para la generación de nuevos virus. Sin embargo, actualmente se ha podido establecer que los humanos también desempeñan un rol similar, ya que pueden ser considerados como responsables de la transmisión de virus de influenza hacia los cerdos, predisponiendo a cambios genéticos de los linajes de influenza porcina, y determinando la aparición de nuevos virus con el riesgo potencial de una pandemia. Las relaciones filogenéticas entre los aislamientos de los virus de influenza porcina de Colombia y algunos virus de influenza humana hacen evidente la existencia de transmisiones inter-especie, lo cual a su vez promueve la evolución constante de las cepas de influenza mediante la introducción de nuevos virus dentro de la especie porcina como se ha descrito en otras investigaciones (Gramer, 2012; Nelson et al., 2012; Zhu et al., 2015). Este hecho resalta la importancia de incrementar las medidas de prevención para disminuir los riesgos de transmisión durante cada etapa donde el contacto humano sea presumible (desde las granjas de producción

hasta las plantas de beneficio). Al establecerse un contacto continuo entre humanos y cerdos es posible la aparición de eventos de transmisión de virus humanos que se adaptan en la especie porcina, y eventualmente pueden mutar y adquirir nuevos rasgos moleculares que les permitan infectar a los huéspedes humanos y convertirse en un gran riesgo epidemiológico.

Es importante mencionar que la estrategia de muestreo empleada en los cerdos al sacrificio durante este estudio mostró ser efectiva para lograr la detección molecular y el aislamiento viral, siendo útil en la realización de pruebas de tipo *screening*, utilizando cerdos en etapa de finalización en las plantas de beneficio, lo cual ha sido descrito en otros estudios alrededor del mundo (Zhu et al., 2011; Qi et al., 2012; Fan et al., 2012; Chen et al., 2013; Pascua et al., 2013; Qiao et al., 2014; Lee et al., 2015). Tales hallazgos evidencian que es posible obtener información de gran relevancia para el monitoreo de los virus de influenza a nivel nacional, mediante la aplicación de esta metodología, ya que las plantas de beneficio proveen acceso a un amplio rango de animales, los cuales proceden de diferentes granjas y ubicaciones a lo largo del país, permitiendo la descripción de situaciones regionales que contribuyen con información de gran relevancia para analizar el contexto nacional relacionado con la epidemiología de los virus de influenza

Realizar la trazabilidad de los virus de influenza hasta los cerdos en las plantas de beneficio permite suponer que las infecciones por este agente ocurren de forma permanente en las granjas y se encuentran presentes en los animales hasta la etapa de finalización sin evidencia de una enfermedad clínica, lo cual puede ser indicativo del mantenimiento de una infección de tipo subclínica que requiere ser investigada y considerada en la implementación de medidas de control. Estos resultados coinciden con otros reportes (Bowman et al., 2012; Dagan et al., 2014; Takemae et al., 2016) y deben ser analizados con el objetivo de desarrollar nuevos estudios que permitan identificar los factores de riesgo que puedan favorecer el mantenimiento de la infección a lo largo de la cadena productiva, que en última instancia se traduce en la circulación permanente e inaparente del virus dentro de las granjas.

Los resultados presentados en este trabajo permiten el análisis del contexto general de Colombia relacionado con la circulación del virus de influenza en las granjas comerciales

y pueden ser utilizados como un modelo para llevar a cabo estudios exhaustivos que profundicen en el contexto epidemiológico del virus de influenza A en poblaciones de cerdos a nivel nacional, así como también a nivel local en las granjas productoras. Es de recalcar que esta estrategia permitió además de la detección molecular el aislamiento de cepas de campo de diferentes regiones geográficas, adquiriendo una mayor relevancia, al permitir a los investigadores realizar nuevos estudios con el fin de caracterizar virus de diferentes procedencias y así determinar los aspectos moleculares y antigénicos que es indispensable considerados para tomar decisiones y establecer medidas de control, condicionadas por la dinámica del virus de influenza y las particularidades de la industria porcina en nuestro país. Estas decisiones deben ser tomadas en consideración como un mecanismo de mitigación en la aparición de posibles eventos de pandemia o brotes de la enfermedad en el futuro.

4.2 Conclusiones

El virus de la influenza porcina es considerado un agente infeccioso prevalente entre los cerdos de Colombia como se ha descrito en otras investigaciones y está involucrado en infecciones que contribuyen al cuadro clínico manifestado en el complejo respiratorio porcino. Las primeras investigaciones realizadas en Colombia permitieron distinguir entre los subtipos H1N1 clásico y H3N2 como aquellos de mayor presencia dentro de esta población (Cucaita, 2005; Hanssen et al., 1977; Mogollon et al., 2003; Moscoso & Neira, 2001); sin embargo, se ha podido establecer que la aparición de la cepa H1N1pdm09 juega un papel importante al contribuir en la infección de los cerdos, como se pudo evidenciar en los resultados de detección molecular y aislamiento viral. Comúnmente se asocian mayores tasas de mutación y de rearreglos a esta cepa pandémica y la confirmación de su presencia en la población porcina colombiana debe ser considerada como un llamado para incrementar los estudios epidemiológicos que permitan prevenir futuros brotes.

El establecer la presencia del virus de influenza A en los cerdos mediante pruebas moleculares demuestra la circulación continua de estos virus en Colombia, lo cual es notablemente importante en las tres áreas de mayor producción (Cundinamarca, Valle y Antioquia) donde su presencia es confirmada nuevamente (Karlsson et al., 2013;

Ramirez-Nieto, 2012). De igual forma, los resultados descritos en este estudio evidencian la circulación permanente de la cepa H1N1pdm09, que fue establecida empleando pruebas moleculares y de aislamiento viral. El análisis filogenético mostró el origen pandémico de los genes analizados hasta el momento, asociándose a cepas reportadas en Sudamérica, Estados Unidos, Asia y Europa a partir de huéspedes humanos y porcinos. Sin embargo, es posible establecer la existencia de eventos de rearreglo en las cepas endémicas previos a la aparición de la cepa pandémica, debido que los genes NS y M de los aislamientos colombianos obtenidos durante 2008 se relacionan a aquellos encontrados en el virus de influenza pandémico de 2009, mientras que los genes externos están relacionados al linaje clásico de influenza porcina.

Es importante considerar una distribución geográfica de los virus teniendo en cuenta que los cuatro aislamientos detectados en Antioquia están estrechamente relacionados entre sí para cada uno de los genes analizados, pero al ser comparados con el aislamiento obtenido en Cundinamarca se muestra un mayor grado de divergencia, describiendo un evento de transmisión independiente hacia la población porcina. Los virus de influenza aislados recientemente no muestran un grado alto de similitud con las cepas obtenidas en 2008, 2009, 2010 y 2011, lo cual probablemente esté asociado a un origen diferente, aunado al hecho que, desde su aparición durante 2009, las cepas pandémicas son transmitidas constantemente a los cerdos, resultando en nuevos cambios moleculares y nuevas vías de evolución. Los mecanismos de variación molecular son considerados un medio que contribuye al surgimiento de nuevos virus y se requiere continuar con el estudio de los virus de influenza en cerdos para identificar y caracterizar nuevas cepas que podrían convertirse en una preocupación no solo para la salud animal sino para la salud pública a nivel global.

4.3 Recomendaciones

Es necesario continuar con estudios de caracterización molecular que permitirán analizar en profundidad los linajes del virus de influenza en cerdos en Colombia, estableciendo la presencia de cepas de otros orígenes como H3N2 porcino o H1N1 de tipo clásico.

Se puede plantear la utilización de estudios serológicos, que permitan diferenciar la respuesta inmune humoral de una población de cerdos frente a diferentes tipos del virus, con el fin de establecer la presencia de anticuerpos contra diferentes cepas y describir los niveles de exposición a los que han sido sometidos. Es necesario establecer estas variables en las explotaciones porcinas para describir las condiciones y factores que promueven o modifican los flujos de transmisión dentro de la población y los riesgos de infección que influyen en los diferentes grupos etarios; tales hallazgos permitirían determinar la prevalencia del virus en las granjas y proponer las medidas que permitan prevenir la entrada y diseminación de esta enfermedad y mitigar las pérdidas asociadas a ésta.

Se resalta la importancia de continuar con el análisis genómico de los virus aislados hasta el momento, mediante la secuenciación completa de todos sus segmentos. Lo anterior con el fin de establecer la estructura genómica completa de las cepas virales, permitiendo describir las relaciones con diversos virus reportados alrededor del mundo y analizar la aparición de cambios moleculares y eventos de rearreglos con otros linajes de influenza.

Se debe profundizar en el conocimiento actual de los virus de influenza circulantes en Colombia ya que esto repercute en la instauración y diseño de nuevas estrategias que contribuyan a ejecutar mejores prácticas de manejo dentro de las granjas, focalizadas en la disminución de los eventos de transmisión e infección. En este sentido, también se hace necesario gestionar la cooperación de las diferentes entidades públicas y privadas en el país, y lograr su participación en estudios que permitan investigar este agente viral desde los diferentes niveles de impacto, considerando las diversas especies involucradas y los múltiples factores que interactúan en la naturaleza de la enfermedad. Es de resaltar, que la influenza A en cerdos no es considerada una enfermedad de control oficial en el país; no obstante, se deben considerar la instauración de nuevos métodos de vigilancia, teniendo en cuenta un enfoque integrativo relacionado al concepto de “*One health*”, que determina el control de la infección por este virus en los diversos huéspedes de interés, e involucrando a diversos profesionales de la salud humana y animal, lo que permitirá mejorar la eficiencia y efectividad de las medidas de prevención que existen actualmente

4.4 Perspectivas

A pesar de los múltiples esfuerzos a nivel internacional, aún existen múltiples incógnitas relacionadas con el virus de influenza, desde el virus mismo y sus interacciones con la célula huésped, pasando por un amplio rango de hospedadores en aumento y enfrentando desafíos para prevenir y/o controlar la infección en poblaciones tanto humanas como de animales.

En cuanto a la situación en el país el desconocimiento es aún mayor y los estudios disponibles son limitados por lo tanto es esencial aunar esfuerzos y contribuir en la construcción de dicho conocimiento. Se requiere extender los estudios de detección y caracterización de los virus de influenza abarcando además de los cerdos otras especies de interés como equinos, aves y humanos, así como especies silvestres tanto de mamíferos como aves, que son un componente epidemiológico clave en la dinámica de transmisión de estos agentes y contribuyen a la evolución permanente derivada de nuevos cambios genéticos. Existe poca información relativa a la ecología natural de estos virus en nuestro país y es importante registrar nuevas evidencias acerca de posibles eventos de transmisión inter-especie que puedan tener implicaciones en la salud pública global y en la sanidad de las diferentes especies animales.

Considerando que se cuenta con aislamientos de cepas de campo del virus de influenza, se debe plantear la posibilidad de realizar nuevos trabajos de investigación enfocados en analizar las características antigénicas y de patogenicidad de estas cepas, empleando modelos *in vitro* o *in vivo*. De igual forma es necesario establecer posibles cambios derivados de eventos de adaptación en los segmentos genómicos de estos virus, los cuales puedan tener repercusiones en la salud pública y/o animal. Asimismo, es necesario estimar las características de infectividad de los aislamientos, y realizar comparaciones relativas a la tasa de replicación de estas cepas, tropismo tisular y posibles patrones de excreción durante los eventos de infección, contrastando tales hallazgos con valores relacionados con la respuesta inmune humoral y celular para determinar parámetros que favorecen los mecanismos de infectividad, los cuales pueden constituir una herramienta para diseñar nuevas estrategias para prevenir o mitigar el impacto de esta enfermedad.

A. Anexo: Secuencias de los aislamientos obtenidos

A/swine/Colombia/1-019/2015 Gen HA

GCAGGGTGACAAAAACATAATGGACTCCAACACTATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCATATCCGCAAG
CGATTTGCAGACAATGGATTAGGTGACGCCCCATTCTTGATCGGCTCCGCCGAGATCAAAAGTCCTTAAAGGAAGA
GGCAACACCCCTTGGCCTCGATATCGAAACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATCATGGAATGGATCTTGAAAGAGGAA
TCCGGCGAGACACTTAGGATGACAATTGCATCTGTACCTACCTCGCGTTACCTTTCTGACATGACCCTCGAGGAAATGT
CACAAAACCTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAAAAGATAATAGGACCTCTTTCGCGTGCATTGGACCAGACGGTCATGG
AAAAGAACATAGTACTGAAAGCGAACTTCAGTGTAATCTTCAACCGATTAGAGACCTTGGTACTACTAAGGGCTTTCAC
AGAGGAGGGAGCAATAGTTGGAGAAATTTACCATTACCTCTCTTCCAGGACATACTTATGAGGATGTCAAAATGCA
GTTGGGGTCCTCATCGGAGAACTTGAATGGAATGGTAACACGGTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTCGCTTGG
AGAACTGTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAAAGCAGAAATGAAAAGTGGCGAGAGCAATTGGGACAGAA
ATTTGAGGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACAGATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTCGAACAAATAACA
TTTATGCAAGCCTTACAACACTACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTCTCGTTTCAGC

A/swine/Colombia/1-019/2015 Gen NA

GGGAGCAAAAGCAGGAGTTTAAAAATGAATCCAAATCAAAAGATAATAAGCATTGGTTCGGTCTGTATGACAATTGGAA
TGGCTAACTTAATATTGCAAAATGGAAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATTCAACTTGGGAATCAGAATCAG
ATTGAAGCATGCAATCAAAGCGTCATTACTTATGAAAACAACACTTGGGTAAATCAGACATATGTTAACATCAGCAACAC
CAACTTTGCTGCTGGACAGTCAGTGTTTTCCGTGAAATTAGCGGGCAATTCCTCTCTCTGCCCTGTTAGTGGATGGGC
TATATACAGTAAAGACAACAGTATAAGAATCGGTTCCAAAGGGGACGTGTTTGCATAAGGGAACCATTCATATCATGC
TCCCCCTTGAATGCAGAACCTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAG
ACAGGAGCCCATATCGAACCCTAATGAGCTGTCCCATTGGTGAAGTTCCTCTCCATACAACCTCAAGATTTGAGTCAGT
TGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGGATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGT
GGCTGTGTTAAAGTACAACGGCATAATAACAGACACTATCAAAAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCT
GAATGTGCATGTATAAATGGTTCTTGCTTTACCATAATGACCGATGGACCAAGTAATGGACAGGCCTCATACAAGATCT
TCAGAAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTTGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTAC
CCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTATCTTTCAACCAG
AATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTTCGGAGACAATCCACGGCCTGATGATAAGACAGGCAGTT
GTGGTCCAGTATCGTCTAATGGAGCAAATGGAGTAAAGGATTTTCATTCAAGTACGGCAATGGTGTGGATAGGGAG
AACCAAAAGCATTAGTTCAAGAAAAGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCAAACGGATGGACTGGGACAGACAACAACCTC
TCAATAAAGCAAGATATTGTAGGAATAAATGAGTGGTCAGGATATAGTGGGAGTTTTGTTTCAGCATCCAGAACTAACAG
GGCTGGACTGTATAAAACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAACACAATCTGGACTAGCG
GGAGCAGCATATCCTTTTGTTGGTGTAACAGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTA
CCATTGACAAGTAATTTGTTTAAAAAACTCCTTGTTTCT

A/swine/Colombia/1-019/2015 Gen M

GATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATTGCGCA
GAGACTGGAAAGTGCTTTGCAGGAAAGAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTT
GTCACCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACG
CTTTATCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCGAACAACATGGATAGAGCAGTTAACTGTACAAAAGCTCAAA
AGAGAAATAACGTTCCATGGGGCAAAGGAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCCTTGCCAGTTGCATGGGCCTC
ATATACAACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTAGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATT
CACAGCATCGGTCTCACAGACAAATGGCTACTACCACCAATCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCTA
GCACTACGGCAAAGGCTATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCAGAGGCTATGGAGTTGCTAATCAG
ACTAGACAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGACCTTCTTG
AAAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTTTTCGTCATTGCAGCAAAT
ATCATTGGGATCTTGACCTGATATTGTGGATTACTGATCGCCTTTTTTTCAAATGTATTTATCGTCGCTTTAAATACGGT
TTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAATATCAACAGGAACAGCAGAGTGCTGT
GGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTAGAGTAAAAAACTACCTTGTCTTCTACTAATACGAG

A/swine/Colombia/1-019/2015 Gen NS

GCAGGGTGACAAAACATAATGGACTCCAACACTATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCATATCCGCAAG
CGATTTGCAGACAATGGATTAGGTGACGCCCCATTCTTGATCGGCTCCGCCGAGATCAAAAGTCCTTAAAGGAAGA
GGCAACACCCCTTGGCCTCGATATCGAAACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATCATGGAATGGATCTTGAAGAGGAA
TCCGGCGAGACACTTAGGATGACAATTGCATCTGTACCTACCTCGCGTTACCTTTCTGACATGACCCTCGAGGAAATGT
CACAAAACCTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAAAAGATAATAGGACCTCTTTCGCTGCGATTGGACCAGACGGTCATGG
AAAAGAACATAGTACTGAAAGCGAACTTCAGTGTAATCTTCAACCGATTAGAGACCTTGGTACTACTAAGGGCTTTTAC
AGAGGAGGGAGCAATAGTTGGAGAAATTTACCATTACCCTCTCTTCCAGGACATACTTATGAGGATGTCAAAAATGCA
GTTGGGGTCTCATCGGAGAACTTGAATGGAATGGTAACACGGTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTGCTTGG
AGAACTGTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAAAGCAGAAATGAAAAGTGGCGAGAGCAATTGGGACAGAA
ATTTGAGGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACAGATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTCGAACAAATAACA
TTTATGCAAGCCTTACAACACTACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTCTCGTTTCAGC

A/swine/Colombia/3-015/2015 Gen HA

GGGGAAAACAAAAGCWACAAAAATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAACTGCAAAATGCAGACACA
TTATGTATAGGTTATCATGCGAACAAATCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGAAATGTAACAGTAACACACTC
TGTTAATCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAAATGC
AACATTGCTGGATGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCTACATTGTGGAAA
CATTTAGTTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTTCATCGACTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGT
GTCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCAAGACAAGTTTCATGGCCCAATCATGACTCGAGCAAAAGGTGTAACGGCA
GCATGTCCTCATGCAGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCT
CAGCAAATCCTACATTAATGATAAGGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTACCACCCCATCTACTAGTGCTGAC
CAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGAACATCAAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCGGAAA
TAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGACCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTATTAGAGCCGGGAGACAAAA
TAACATTGCAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTGCGAATGGAAAGAAATGATGGATCTGGTATTAT
CATTTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACCTTGTCAGACACCCAAGGGTGTATAAACACCAGCCTCCCATTT
CAGAATATACATCCGATCACAATTGGAAAATGTCCAAAATATGTAAGAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGA
GGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGG
TAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAACGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATG
CCATTGACGAGATTACTAACAAAGTAAATTCGTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTC
AACCACCTGGAAAAAAGATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGA
ACTGTTGGTTCTATTGAAAATGAAAGAACTTTGGACTACCACGATTCAAATGTGAAAACTTATATGAAAAGATAAGAA
GCCAGTAAAAAACAATGCCAAAGAAATTGAAACGGCTGCTTTGAAATTTACCACAAATGCGATAACATGTGCATGGA
AAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACCCAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGAGTA
AAGCTGGAATCAACAAGGATTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCC
TGGGGGCAGTCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAACATTAGGA

A/swine/Colombia/3-015/2015 Gen NA

CCAAAAGATAATAATCATTGGTTCGGTCTGTATGACAATTGGAATGGCTAACTTAATATTACAAATTGGAAACATAATCTC
AATATGGATTAGCCACTCAATTCAACTTGGGAATCAAAATCAGATTGAAACATGCAATCAAAGCGTTATTACTTATGAAA
ACAATACTTGGGTAAATCAGACATATGTCAACATCAGCAATACCAACTTTGCTGCTGGACAATCAGTGGTTCCGTGAA
ATTAGCGGTAATTCCTCTCTTTGCCCTGTTAGTGGATGGGCTATATACAGTAAAGACAACAGTGAAGAATCGGTTCC
AAGGGAGATGTGTTGTCATAAGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCTTGAATGCAGAATTTCTCTTGACTCAAG
GGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAGACAGGAGCCCATATCGAACCCCTAATGAGCTGTCTAT
TGGTGAAGTTCCTCTCCATACAACCTCAAGATTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTCTATGATGGCATCAAT
TGGCTAACAATTGGAATATCTGGCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAATGGCATAATAACAGACACTA
TCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACCCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACTATAATG
ACCGACGGACCAAGTAATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAAAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAA
TGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAAC
TGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGGTACATATGCAGTGGGGTT
TTCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATCGTCTAATGGAGCAAAATGGAGTAAAA
GGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGTTGGATAGGGAGAACTAAAAGCATTAGTTCAAGAAACGGTTTTGAAATGAT
TTGGGATCCGAACGGATGGACTGGAACAGACAATACTTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAAATGAGTGGTCA
GGATATAGTGGGAGTTTTGTTCAACATCCAGAATAACAGGGCTGGATTGTATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAA
TCAGAGGGCGACCCAAAGAGAACACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGGGTAAACGGTGACACT
GTGGGTTGGTCTTGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCATTGACAAGTAATTTGTTCAAAAAA

A/swine/Colombia/3-015/2015 Gen M

GATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCA
GAGACTGGAAAGTGTCTTTGCAGGAAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTTG
TCGCCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGC
TTTGTCCAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCAAACAACATGGATAGAGCAGTTAACTATACAAGAAGCTCAAAA
GAGAAATAACGTTCCATGGGGCCAAAGAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCACCTGCCAGTTGCATGGGTCTCA
TATAACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATTC
ACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCTACTACCACTAATCCACTAATCAGACATGAAAACAGAATGGTGTGGCTAG
CACTACGGCAAAGGCTATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGGTTGCTAATCAGA
CTAGGCAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAACTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGACCTTCTTGA
AAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAATA
TCATTGGGATCTTGACCTGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTCAAATGTATTTATCGTCGCTTTAAATACGGTT
TGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAATATCAACAGGAACAGCAGAGTGCTGTG
GATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTAAAG

A/swine/Colombia/3-015/2015 Gen NS

AAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGACTCCAACACCATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCATATCCG
CAAGCGATTTGCAGACAATGGATTGGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTCCGCCGAGACCAAAAGTCCTTAAAAGG
AAGAGGCAGCACCCCTTGGCCTCGATATCGAAACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATAGTGGAATGGATCTTGAAAGA
AGAATCCAGCGAAACACTTAGAATGACAATTGCATCTGTACCTACTTCGCGCTACCTTTCTGACATGACTCTCGAAGAA
ATGTCACGAGACTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAGAAGATAATAGGCCCTCTTTGCGTGCGATTGGACCAGGCGGTC
ATGGAAAAGAACATAATACTAAAAGCGAACTTCAGTGTAATCTTTAACCGATTAGAGACCTTGATACTACTAAGGGCTTT
CACTGAGGAGGGAACAATAGTTGGAGAAATTCACCATTATCCTCTCTTCCAGGACATACTTATGAGGATGTCAAAAAT
GCAGTTGGGGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGGTAACACGGTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTCGCT
TGGAGAACTGTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAGAGCAGAAATGAAAAGTGGCGAGAGCAATTGGGACA
GAAATTTGAAGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACAGATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTCGAACAAATA
ACATTTATGCAAGCCTTACAACACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGA

A/swine/Colombia/3-020/2015 Gen HA

CAAAAATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAACTGCAAAATGCAGACACATTATGTATAGGTTATCAT
 GCGAACAATTCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGTTAATCTTCTAGAAGA
 CAAGCATAACGGGAAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAAATGCAACATTGCTGGATGGAT
 CCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCTACATTGTGGAACATTTAGTTCAGACAAT
 GGAACGTGTTACCCAGGAGATTTTCATCGACTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTATCATTTGAAAGGT
 TTGAGATATTTCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAGCAAAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCAG
 GAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATT
 AATGATAAGGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTACCCACCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATC
 AGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGAACATCAAGATACAGCAAAAAGTTCAAGCCGGAATAGCAATAAGACCCAA
 AGTGAGGGACCAAGAAGGGAGAATGAATTAATCTGGACACTATTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAAC
 TGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAGAAATGATGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATACACCA
 GTCCACGATTGCAATACAACTTGTGAGACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTTCAGAATATACATCCGA
 TCACAATTGGAATGTCCAAAATATGTAAGAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTAT
 TCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACG
 GTTATCACCATCAAAACGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTA
 CTAACAAAGTAAATTTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAA
 AGAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAAGTGTGGTTCTATT
 GGAAATGAAAGAAGCTTTGGACTACCACGATTCAATGTGAAAACTTATATGAAAAGATAAGAAGCCAGTTAAAAACA
 ATGCCAAAGAAATTTGGAACGGCTGCTTTGAATTTACCACAAATGCGATAACATGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGG
 GACTTATGACTACCCAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGAGTAAAGCTGGAATCAACA
 AGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAGTCAGTT
 TCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAACATTAGGATTTTCAGAAGTACGAGAAAA

A/swine/Colombia/3-020/2015 Gen NA

AGCAAAAGCAGGAGTTTAAATGAATCCAAACCAAAAGATAATAATCATTGGTTCGGTCTGTATGACAATTGGAATGGCT
 AACTTAATATTACAAATTGGAAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATTCAACTTGGGAATCAAAATCAGATTGAA
 ACATGCAATCAAAGCGTTATTACTTATGAAAACAATACTTGGGTAAATCAGACATATGTCAACATCAGCAATACCAACTT
 TGCTGCTGGACAATCAGTGGTTTCCGTGAAATTAGCGGGTAATTCCTCTCTTTGCCCTGTTAGTGGATGGGCTATATAC
 AGTAAAGACAACAGTGTAGAATCGGTTCCAAGGGAGATGTGTTTGCATAAGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCT
 TGGAATGCAGAACTTTCTTCTTGAAGTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAGACAGGAG
 CCCATATCGAACCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAACTCAAGATTCGAGTCAGTCGCTTGG
 TCAGCAAGTGCTTGTGATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATATCTGGCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTG
 TTAAGTACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACCCAAGAGTCTGAATGTG
 CATGTGTAATGGTTCTTGCTTTACTATAATGACCGACGGACCAAGTAATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAAAATA
 GAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATT
 CTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGG
 AATATCAGATAGGGTACATATGCAGTGGGGTTTTCGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTC
 CAGTATCGTCTAATGGAGCAAATGGAGTAAAGGATTTTCAATCAATACGGCAATGGTGTGGATAGGGAGAACTAA
 AAGCATTAGTTCAAGAAACGGTTTTGAAATGATTTGGGATCCGAACGGATGGACTGGAACAGACAATAACTTCTCAATA
 AAGCAAGATATCGTAGGAATAATGAGTGGTCAGGATATAGTGGGAGTTTTGTTCAACATCCAGAACTAACAGGGCTGG
 ATTTGATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAACACAATCTGGACTAGCGGGAGCA
 GCATATCCTTTTGTGGGGTAAACGGTGACACTGTGGTTGGTCTTGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCATTG
 ACAAGTAATTTGTTCAAAAAAATCCTTGTTTCTACTAA

A/swine/Colombia/3-020/2015 Gen M

GAGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTGGAAAGTGTC
TTTGCAGGAAAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTTGTCGCCTCTGACTAAGG
GAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCC
TAAATGGGAATGGGGACCCAAACAACATGGATAGAGCAGTTAACTATACAAGAAGCTCAAAAGAGAAATAACGTTCCA
TGGGGCCAAAGAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCACTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGG
AACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATTCACAGCATCGGTCTCAC
AGACAGATGGCTACTACCACTAATCCACTAATCAGACATGAAAACAGAATGGTGCTGGCTAGCACTACGGCAAAGGCT
ATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGGTTGCTAATCAGACTAGGCAGATGGTACA
TGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAACTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGACCTTCTTGAAAAATTTGCAGGCCTAC
CAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAATATCATTGGGATCTTGCA
CCTGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTCAAATGTATTTATCGTCGCTTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTTC
TACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAATATCAACAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTC
ATTTTGTCAACATAGAGCTAAAGTAAAAAACTACCTTGTCTTCTACTAATACGAG

A/swine/Colombia/3-020/2015 Gen NS

TTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTGACAAAACATAATGGACTCCAACACCATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTT
CCTTTGGCATATCCGCAAGCGATTTGCAGACAAATGGATTGGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTCCGCCGAGACCA
AAAGTCCTTAAAGGAAGAGGCAGCACCTTGGCCTCGATATCGAAACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATAGTGGA
ATGGATCTTGAAAGAAGAATCCAGCGAAACACTTAGAATGACAATTGCATCTGTACCTACTTCGCGCTACCTTTCTGAC
ATGACTCTCGAAGAAATGTCACGAGACTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAGAAGATAATAGCCCTCTTTGCGTGCGAT
TGGACCAGGCGGTCTATGAAAAAGAACATAATACTAAAAGCGAACTTCAGTGTAATCTTTAACCGATTAGAGACCTTGAT
ACTACTAAGGGCTTTCACTGAGGAGGGAACAATAGTTGGAGAAATTTACCATTTATCCTCTCTTCCAGGACATACTTAT
GAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGGGTCCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGGTAACACGGTTTCAGTCTCTGAAAAT
ATACAGAGATTGCTTGSAGAACTGTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAGAGCAGAAATGAAAAGTGGCG
AGAGCAATTGGGACAGAAATTTGAAGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACAGATTGAAAGCGACAGAGAA
TAGTTTCGAACAAATAACATTTATGCAAGCCTTACAACACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAG

A/swine/Colombia/3-021/2015 Gen HA

TCAGGGAGCAAAAGCAGGGGAAAACAAAAGCTACAAAAATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAAC
TGCAAATGCAGACACATTATGTATAGGTTATCATGCGAACAAATTCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGAAT
GTAACAGTAACACACTCTGTTAATCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAACCTAAGAGGGGTAGCCCCAT
TGCATTTGGGTAAATGCAACATTGCTGGATGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATG
GTCCTACATTGTGGAAACATTTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTTCATCGACTATGAGGAGCTAAGA
GAGCAATTGAGCTCAGTGTCACTATTTGAAAGGTTTGAGATATCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGA
GCAAAGGTGTAAACGGCAGCATGTCCTCATGCAGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAAGG
AAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAGGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTACCAC
CCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGAACATCAAGATACAGCA
AAAAGTTCAAGCCGGAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGACCAAGAAGGGAGAATGAACCTATTACTGGACACTAT
TAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTGCAAGCAACTGGAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTGCAATGGAAAGAA
ATGATGGATCTGGTATTATCATTTAGATACACCAAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTCAGACACCCAAGGGTGCTAT
AAACACCAGCCTCCCATTTGAGAATATACATCCGATCACAATTGGAATGTCCAAATATGTAAGAAGCACAAAATTGA
GACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAG
GGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAACGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGAC
CTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTTAC
AGCAGTAGGTAAAGAGTTCAACCACTGGAAAAAGAAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCCTGGAC
ATTTGGACTTACAATGCCGAAGTGTGGTTCTATTGGAATGAAAGAACTTTGGACTACCACGATTCAAATGTGAAAAA
CTTATATGAAAAGATAAGAAGCCAGTTAAAAACAATGCCAAAGAAATTGGAAACGGCTGCTTTGAATTTTACCACAAAT
GCGATAACATGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACCCAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAG
AGAAGAAATAGATGGAGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTCA
TTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAGTCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTT
AACATTAGGATTTGAGAAGTACG

A/swine/Colombia/3-021/2015 Gen NA

GCAGGAGTTTAAATGAATCCAAACCAAAGATAATAATCATTGGTTCGGTCTGTATGACAATTGGAATGGCTAACTTAA
TATTACAAATTGGAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATTCAACTTGGGAATCAAAATCAGATTGAAACATGC
AATCAAAGCGTTATTACTTATGAAAACAATACTTGGGTAAATCAGACATATGTCAACATCAGCAATACCAACTTTGCTGC
TGGACAATCAGTGGTTCCGTGAAATTAGCGGGTAATTCCTCTCTTTGCCCTGTTAGTGGATGGGCTATATACAGTAAA
GACAACAGTGTAAGAATCGGTTCCAAGGGAGATGTGTTTGTCTAAGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCTTGGAAT
GCAGAACTTTCTTCTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAGACAGGAGGCCATA
TCGAACCCTAATGAGCTGTCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAACCTCAAGATTCGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCA
AGTGCTTGTCTATGATGGCATCAATTGGCTAACAAATTGGAATATCTGGCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGT
ACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGT
AAATGGTTCTTGTCTTACTRTAATGACCGACGGACCAAGTAATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAAAATAGAAAAG
GGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGA
AATCATCATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCA
GATAGGGTACATATGCAGTGGGGTTTTTCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATC
GTCTAATGGAGCAAATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGGATAGGGAGAACTAAAAGCATT
AGTTCAAGAAACGGTTTTGAAATGATTTGGGATCCGAACGGATGGACTGGAACAGACAATAACTTCTCAATAAAGCAAG
ATATCGTAGGAATAAATGAGTGGTCAGGATATAGTGGGAGTTTTGTTCAACATCCAGAACTAACAGGGCTGGATTGTAT
AAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAACACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATATC
CTTTTGTGGGGTAAACGGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCATTGACAAGTA
ATTTGTTCAAAAAAATCCTTGTCTACTA

A/swine/Colombia/3-021/2015 Gen M

AGTAGATATTAAAGATGAGTCTTCTAACCAGAGGTGAAACGTACGTTCTTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGC
CGAGATCGCGCAGAGACTGGAAAGTGTCTTTCAGGGAAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGAC
AAGACCAATCTTGTGCGCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACT
GCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCAAACAACATGGATAGAGCAGTTAACTATA
CAAGAAGCTCAAAAGAGAAATAACGTTCCATGGGGCCAAAGAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCCTTGCCAG
TTGCATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAA
CAGATTGCTGATTCACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCTACTACCACTAATCCACTAATCAGACATGAAAACAGAA
TGGTGCTGGCTAGCACTACGGCAAAGGCTATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGA
GGTTGCTAATCAGACTAGGCAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAACTCCAGTGCTGGTCTGAAA
GATGACCTTCTTGAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGT
CATTGCAGCAAATATCATTGGGATCTTGACCTGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTCAAATGTATTATCGTCG
CTTTAAATACGGTTTGAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAATATCAACAGGAACA
GCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTGTCAACATAGAGCTAAAGTAAAAAATACCTTGTTTCTACTAATAC
GAGACGATA

A/swine/Colombia/3-021/2015 Gen NS

GAGCAAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGACTCCAAACACCATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCATA
TCCGCAAGCGATTTGCAGACAATGGATTGGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTCCGCCGAGACCAAAAGTCCTTAA
AAGGAAGAGGCAGCACCCCTTGGCCTCGATATCGAAACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATAGTGGAATGGATCTTGA
AAGAAGATCCAGCGAAACACTTAGAATGACAATTGCATCTGTACCTACTTCGCGCTACCTTTCTGACATGACTCTCGA
AGAAATGTCACGAGACTGGTTCATGCTCATGCCTAGGCAGAAGATAATAGGCCCTCTTTGCGTGCGATTGGACCAGGC
GGTCATGGAAAAAGACATAATACTAAAAGCGAACTTCAGTGAATCTTTAACCGATTAGAGACCTTGATACTACTAAGGG
CTTTCACTGAGGAGGGAACAATAGTTGGAGAAATTTACCATTATCCTCTCTTCCAGGACATACTTATGAGGATGTCAAA
AATGCAGTTGGGGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGGTAACACGGTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTC
GCTTGGAGAACTGTGATGAGAATGGGAGACCTTCACTACCTCCAGAGCAGAAATGAAAAGTGGCGAGAGCAATTGGG
ACAGAAATTTGAAGAAATAAGGTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACAGATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTGAACAA
ATAACATTTATGCAAGCCTTACAACCTACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATG
ATA

A/swine/Colombia/3-027/2015 Gen HA

TCAGGGAGCAAAAGCAGGGGAAAAACAAAGCWACAAAAATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAA
CTGCAATGCAGACACATTATGTATAGTTATCATGCGAACAATTCACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAAGAAAT
GTAACAGTAACACACTCTGTTAATCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAATAAGAGGGGTAGCCCCAT
TGCATTTGGGTAAATGCAACATTGCTGGATGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATG
GTCCTACATTGTGGAACATTTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTTCATCGACTATGAGGAGCTAAGA
GAGCAATTGAGCTCAGTGTATCATTTTGAAGGTTTGAGATATCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGA
GCAAAGGTGTAAACGGCAGCATGTCCTCATGCAGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAGG
AAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAGGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTACCAC
CCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGAACATCAAGATACAGCA
AAAAGTTCAAGCCGGAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGACCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAT
TAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTGGAAGCAACTGGAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTGCAATGGAAAGAA
ATGATGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACCTTGTGAGACACCCAAGGTGCTAT
AAACACCAGCCTCCCATTTTCAGAATATACATCCGATCACAATTGGAATAATGTCCAAAATATGTAAGAAGCACAAAATTGA
GACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAG
GGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAACGAGCAGGGGTGAGGATATGCAGCCGAC
CTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAGTAAATTTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTTAC
AGCAGTAGGTAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAAGAAATAGAGAATTTAAATAAAAAGTTGATGATGGTTTCCTGGAC
ATTTGGACTTACAATGCCGAAGTGTGGTTCTATTGGAAAATGAAAGAACTTTGACTACCACGATTCAATGTGAAAAA
CTTATATGAAAAGATAAGAAGCCAGTTAAAAACAATGCCAAAGAAATTGGAAACGGCTGCTTTGAATTTTACCACAAAT
GCGATAACATGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACCCAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAG
AGAAGAAATAGATGGAGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTGCGCCAGTTCA
TTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAGTCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTT
AACATTAGGATTTTCAAGATACGAGAAAAACACCCTTGTCTTCTAC

A/swine/Colombia/3-027/2015 Gen NA

GGGAGCAAAAGCAGGAGTTTAAATGAATCCAAACCAAAAGATAATAATCATTGGTTCGGTCTGTATGACAATTGGAAT
GGCTAACTTAATATTACAAATTGGAAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATTCAACTTGGGAATCAAAATCAGAT
TGAAACATGCAATCAAAGCGTTATTACTTATGAAAAACAATACTTGGGTAAATCAGACATATGTCAACATCAGCAATACCA
ACTTTGCTGCTGGACAATCAGTGGTTTCCGTGAAATTAGCGGGTAATTCCTCTCTTTGCCCTGTTAGTGGATGGGCTAT
ATACAGTAAAGACAACAGTGTAAAGAATCGGTTCCAAGGGAGATGTGTTGTGATAAGGGAACCATTCATATCATGCTCC
CCCTTGGAAATGCAGAACTTTCTTCTTGACTCAAGGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAGACA
GGAGCCCATATCGAACCCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCTCTCCATACAACCTCAAGATTGCGAGTCAGTCGC
TTGGTCAGCAAGTGCTTGTGTCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATATCTGGCCAGACAATGGGGCAGTGGC
TGTGTTAAAGTACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACCAAGAGTCTGAAT
GTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACTRTAATGACCGACGGACCAAGTAATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAA
AATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCT
GATTCTAGTGAAATCAGATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGCTTTCAACCAGAAT
CTGGAATATCAGATAGGGTACATATGCAGTGGGRTTTTCGGAGACAATCCACGCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGT
GGTCCAGTATCGTCTAATGGAGCAAATGGAGTAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGTTGGATAGGGAGAA
CTAAAAGCATTAGTTCAAGAAACGGTTTTGAAATGATTGTTGGGATCCGAACGGATGGACTGGAACAGACAATAACTTCTC
AATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAAATGAGTGGTCAGGATATAGTGGGAGTTTTGTTCAACATCCAGAACTAACAGGG
CTGGATTGTATAAGACCTTGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAACACAATCTGGACTAGCGGG
AGCAGCATATCCTTTTGTGGGGTAAACGGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACC
ATTGACAAGTAATTTGTTCAAAAAAATCCTTGTCTACTAATACGAGACG

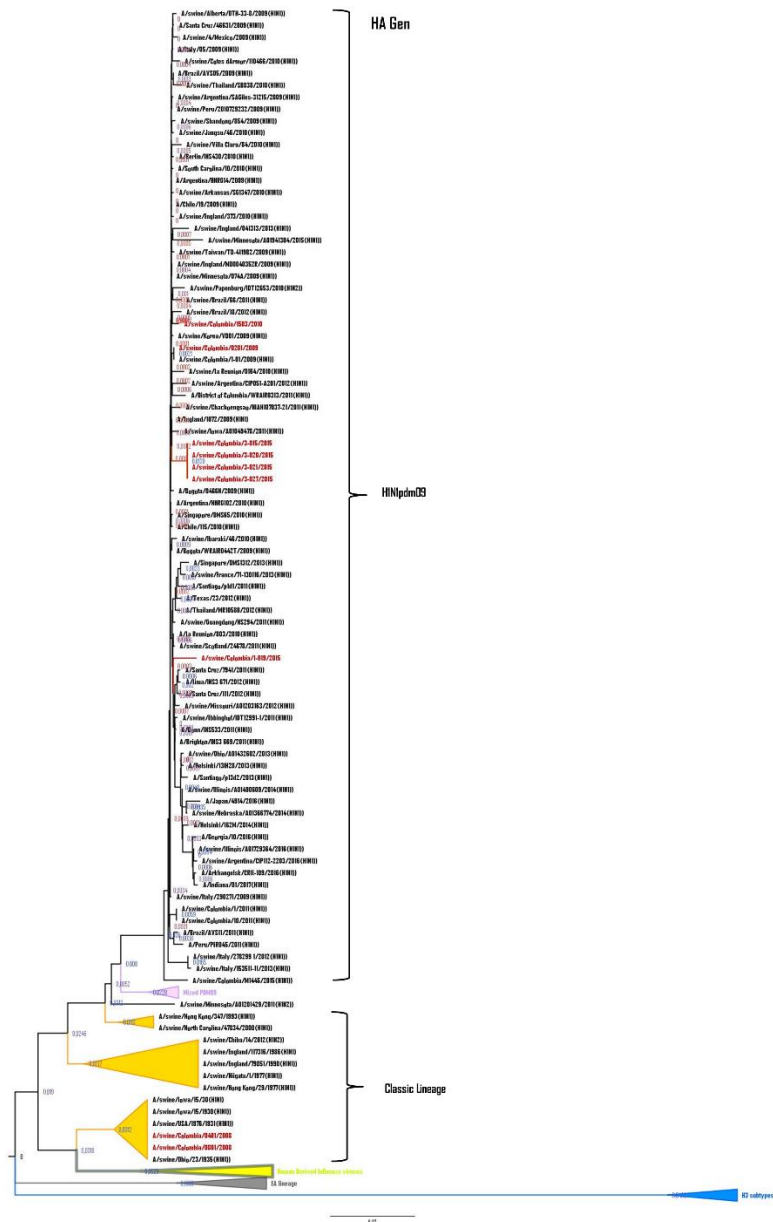
A/swine/Colombia/3-027/2015 Gen M

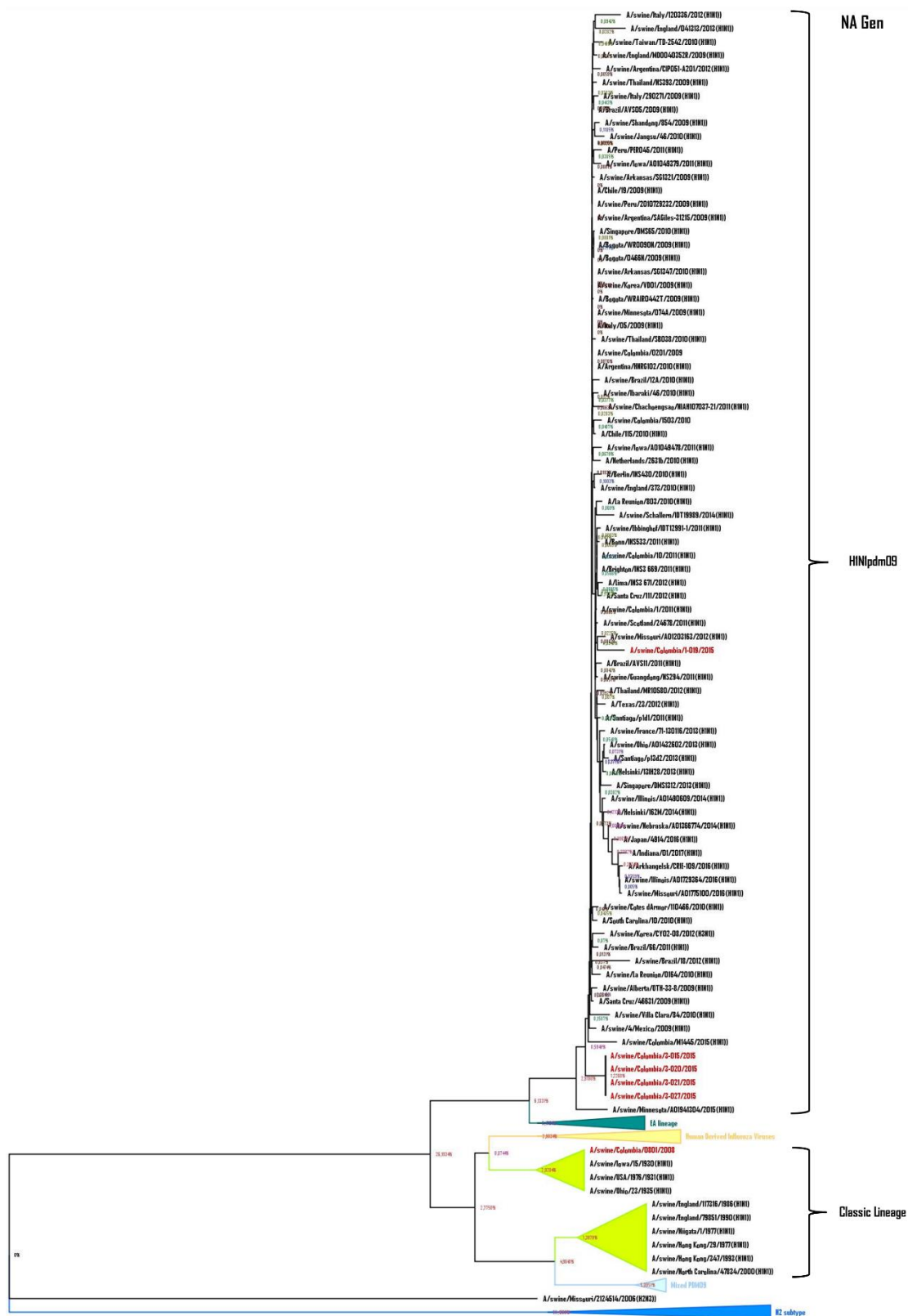
AGATATTTAAAGATGAGTCTTCTAACCAGAGGTGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCG
AGATCGCGCAGAGACTGGAAAGTGCTTTGCAGGAAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAA
GACCAATCTTGTGCCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGC
AGCGTAGACGCTTTGTCCAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCAAACAACATGGATAGAGCAGTTAACTATACAA
GAAGCTCAAAGAGAAATAACGTTCCATGGGGCCAAAGAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCACCTGCCAGTTG
CATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAACA
GATTGCTGATTACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGCTACTACCACTAATCCACTAATCAGACATGAAAACAGAATG
GTGCTGGCTAGCACTACGGCAAAGGCTATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGG
TTGCTAATCAGACTAGGCAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAACTCCAGTGCTGGTCTGAAAGA
TGACCTTCTTGAAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCA
TTGCAGCAAATATCATTGGGATCTTGACCTGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTCAAATGTATTTATCGTCGT
TTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAATATCAACAGGAACAGC
AGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTAAAGTAAAAA

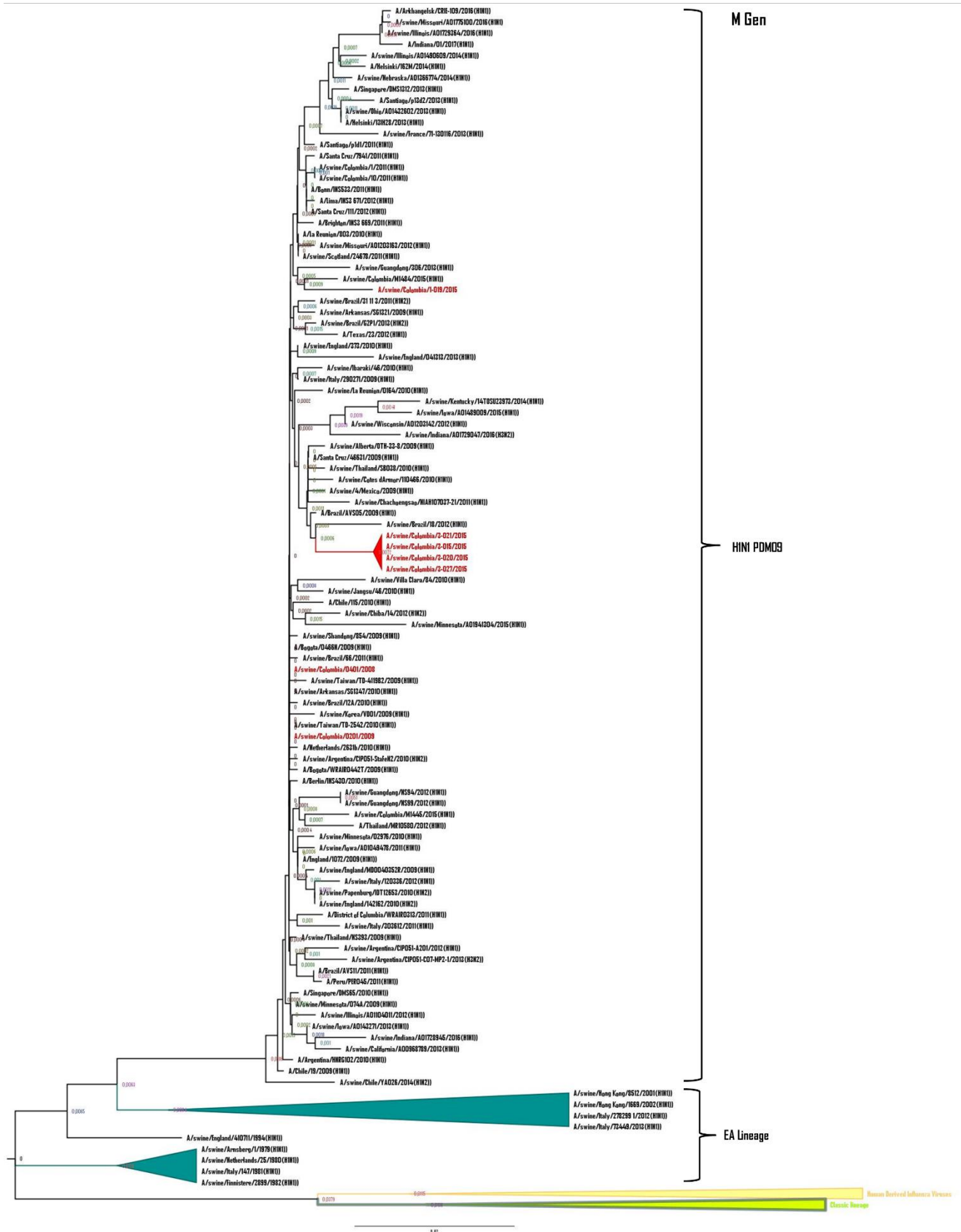
A/swine/Colombia/3-027/2015 Gen NS

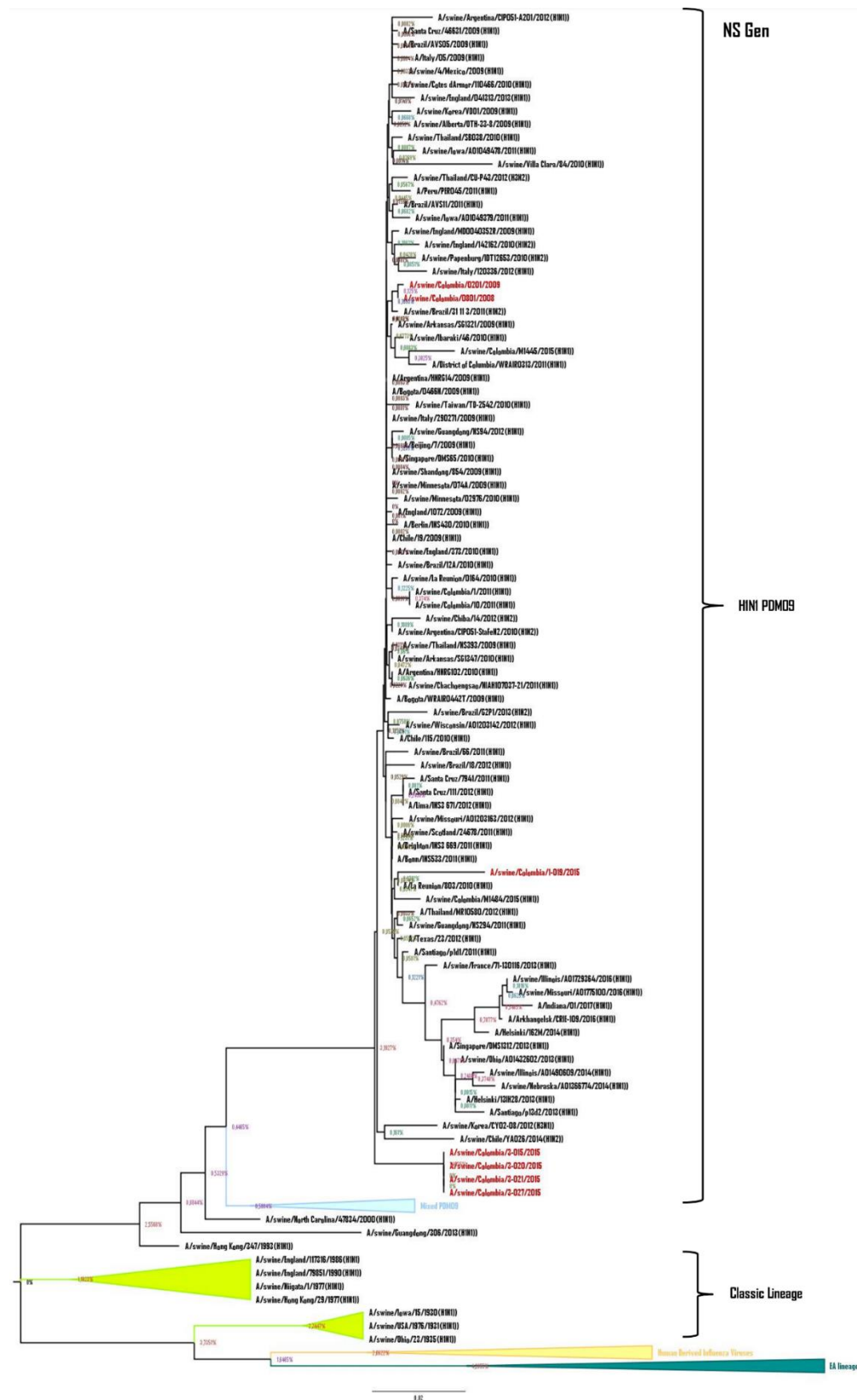
CATAATGGACTCCAACACCATGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGTTTCCTTTGGCATATCCGCAAGCGATTTGCAGACAAT
GGATTGGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTCCGCCGAGACCAAAAGTCCTTAAAGGAAGAGGCAGCACCCCTTGG
CCTCGATATCGAAACAGCCACTCTTGTTGGGAAACAAATAGTGGAATGGATCTTGAAAGAAGAATCCAGCGAAACACTT
AGAATGACAATTGCATCTGTACCTACTTCGCGCTACCTTCTGACATGACTCTCGAAGAAATGTCACGAGACTGGTTCA
TGCTCATGCCTAGGCAGAAGATAATAGGCCCTCTTTGCGTGCGATTGGACCAGGCGGTCATGGAAAAGAACATAATAC
TAAAGCGAACTTCAGTGTAATCTTTAACCGATTAGAGACCTTGATACTACTAAGGGCTTTCACTGAGGAGGGAACAAT
AGTTGGAGAAATTTACCATTATCCTCTCTTCCAGGACATACTTATGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGGGTCCTCATC
GGAGGACTTGAATGGAATGGTAACACGGTTCGAGTCTCTGAAAATATACAGAGATTGCTTGGAGAACTGTGATGAG
AATGGGAGACCTTCACTACCTCCAGAGCAGAAATGAAAAGTGCGGAGAGCAATTGGGACAGAAATTTGAAGAAATAAG
GTGGTTAATTGAAGAAATGCGGCACAGATTGAAAGCGACAGAGAATAGTTTCGAACAAATAACATTTATGCAAGCCTTA
CAACTACTGCTTGAAGTAGAACAAGAGATAAGAGCTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGAT

B. Anexo: Análisis filogenético extendido









C. Anexo: Análisis de similitud de secuencias

Segmento HA									
% Identidad									
Divergencia		1	2	3	4	5	6		
	1	-	97.6%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	1	A/California/04/2009
	2	2.5%	-	96.5%	96.5%	96.5%	96.5%	2	A/swine/Colombia/1-019/2015
	3	1.7%	3.6%	-	100%	100%	100%	3	A/swine/Colombia/3-015/2015
	4	1.7%	3.6%	0	-	100%	100%	4	A/swine/Colombia/3-020/2015
	5	1.7%	3.6%	0	0	-	100%	5	A/swine/Colombia/3-021/2015
	6	1.7%	3.6%	0	0	0	-	6	A/swine/Colombia/3-027/2015
Segmento NA									
% Identidad									
Divergencia		1	2	3	4	5	6		
		-	97.9%	98.1%	98.1%	98.1%	98.1%	1	A/California/04/2009
		2.2%	-	96.5%	96.5%	96.4%	96.4%	2	A/swine/Colombia/1-019/2015
		1.9%	3.6%	-	100%	99.9%	99.9%	3	A/swine/Colombia/3-015/2015
		1.9%	3.6%	0	-	99.9%	99.9%	4	A/swine/Colombia/3-020/2015
		1.8%	3.6%	0	0	-	99.9%	5	A/swine/Colombia/3-021/2015
		1.7%	3.5%	0	0	0	-	6	A/swine/Colombia/3-027/2015

Segmento M									
% Identidad									
Divergencia Divergence		1	2	3	4	5	6		
		-	98.8%	99.1%	99.1%	99.0%	99.1%	1	A/California/04/2009
		1.3%	-	97.8%	97.8%	97.7%	97.8%	2	A/swine/Colombia/1-019/2015
		0.9%	2.2%	-	100%	99.9%	100%	3	A/swine/Colombia/3-015/2015
		0.9%	2.2%	0	-	99.9%	100%	4	A/swine/Colombia/3-020/2015
		1.0%	2.3%	0.1%	0.1%	-	99.9%	5	A/swine/Colombia/3-021/2015
		0.9%	2.2%	0	0	0.1%	-	6	A/swine/Colombia/3-027/2015
Segmento NS									
% Identidad									
Divergencia		1	2	3	4	5	6		
		-	97.7%	98.2%	98.2%	98.2%	98.2%	1	A/California/04/2009
		2.4%	-	96.3%	96.3%	96.3%	96.3%	2	A/swine/Colombia/1-019/2015
		1.9%	3.8%	-	100%	100%	100%	3	A/swine/Colombia/3-015/2015
		1.9%	3.8%	0	-	100%	100%	4	A/swine/Colombia/3-020/2015
		1.9%	3.8%	0	0	-	100%	5	A/swine/Colombia/3-021/2015
		1.9%	3.8%	0	0	0	-	6	A/swine/Colombia/3-027/2015

D. Anexo: Relación de cepas utilizadas en el análisis filogenético

Identificación cepa	Origen/año	Huésped	Subtipo	Genes utilizados	Número de acceso taxón NCBI
(A/WS/1933(H1N1))	Reino Unido/1933	Humano	H1N1	HA, NA, NS	382834
(A/Puerto Rico/8/1934(H1N1))	Puerto Rico/1934	Humano	H1N1	HA, NA, NS y M	211044
A/swine/Cambridge/39	Reino Unido/1933	Cerdo	H1N1	HA	382845
(A/swine/29/1937(H1N1))	USA/1937	Cerdo	H1N1	M	382842
(A/swine/Iowa/15/30(H1N1))	USA/1930	Cerdo	H1N1	HA	260809
(A/swine/England/117316/1986(H1N1))	Inglaterra/1986	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1176077
(A/swine/England/79851/1990(H1N1))	Inglaterra/1990	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1176078
(A/swine/Arnsberg/1/1979(H1N1))	Alemania/1979	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1503429
(A/swine/Netherlands/25/1980(H1N1))	Países bajos/1980	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	158642
(A/swine/Italy/147/1981(H1N1))	Italia/1981	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	384481
(A/swine/Finnistere/2899/1982(H1N1))	Francia/1982	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	157800
(A/swine/England/410711/1994(H1N1))	Inglaterra/1994	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1176051
(A/swine/Potsdam/35/82(H3N2))	Alemania/1982	Cerdo	H3N2	HA, NA, M	183769
(A/swine/Spain/33601/2001(H3N2))	España/2001	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	374436
(A/swine/Germany/Vi3161/95(H3N2))	Alemania/1995	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	487071
(A/swine/Brabant/1984(H3N2))	Países bajos/1984	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	936120
(A/swine/England/163266/1987(H3N2))	Inglaterra/1987	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	1176124
(A/swine/Italy/526/1985(H3N2))	Italia/1985	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	383560
(A/swine/Cotes d'Armor/790/1997(H1N2))	Francia/1997	Cerdo	H1N2	HA, NA,	169162

				NS Y M	
(A/swine/Italy/3592/1999(H1N2)	Italia/1999	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	455318
(A/swine/Bakum/1832/2000(H1N2)	Alemania/2000	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	308981
(A/swine/England/33766/2003(H1N2)	Inglaterra/2003	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	1654143
(A/swine/Italy/50568/2005(H1N2)	Italia/2005	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	930986
(A/swine/Italy/66945/2006(H3N1)	Italia/2006	Cerdo	H3N1	HA, NA	455318
(A/swine/Nordkirchen/IDT1993/2003(H3N2)	Alemania/2003	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	522756
(A/swine/Sweden/1021/2009(H1N2)	Suecia/2009	Cerdo	H1N2	HA, NS Y M	667067
(A/swine/England/MD0040352R/2009(H1N1)	Inglaterra/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1176082
(A/swine/Italy/290271/2009(H1N1)	Italia/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1501091
(A/swine/Cotes d'Armor/110466/2010(H1N1)	Francia/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1273141
(A/swine/Ebbinghof/IDT12991- 1/2011(H1N1)	Alemania/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1263904
(A/swine/Italy/73449/2013(H1N1)	Italia/2013	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1382806
(A/swine/Italy/278299_1/2012(H1N1)	Italia/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1501089
(A/swine/England/142162/2010(H1N2)	Inglaterra/2010	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	1654114
(A/swine/Papenburg/IDT12653/2010(H1N2)	Alemania/2010	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	1263911
(A/swine/Niigata/1/1977(H1N1)	Japón/1977	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	519839
(A/swine/Hong Kong/29/1977(H1N1)	China/1977	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	991258
(A/swine/Hong Kong/347/1993(H1N1)	China/1993	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	991553
(A/swine/Ehime/1/1980(H1N2)	Japón/1980	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	519840
(A/swine/Guangdong/01/1998(H3N2)	China/1998	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	627198
(A/swine/Heilongjiang/1/05(H3N2)	China/2005	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	486630
(A/swine/Guangdong/166/06(H3N2)	China/2006	Cerdo	H3N2	HA, NA,	486629

				NS Y M	
(A/swine/Guangdong/102/2002(H3N2))	China/2002	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	663195
(A/swine/Guangdong/106/2002(H3N2))	China/2002	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	663196
(A/swine/Hong Kong/8512/2001(H1N1))	China/2001	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	649623
(A/swine/Hong Kong/1669/2002(H1N1))	China/2002	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	991195
(A/swine/Korea/CAS05/2004(H3N2))	Corea del Sur/2004	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	538545
(A/swine/Korea/CAS07/2005(H3N2))	Corea del Sur/2004	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	538546
(A/swine/Korea/Hongsong2/2004(H1N2))	Corea del Sur/2004	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	538555
(A/swine/Shandong/854/2009(H1N1))	China/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1032499
(A/swine/Thailand/NS393/2009(H1N1))	Tailandia/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1311614
(A/swine/Korea/VD01/2009(H1N1))	Corea del Sur/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	717529
(A/swine/Ibaraki/46/2010(H1N1))	Japón/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1820581
(A/swine/Guangdong/NS94/2012(H1N1))	China/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1511974
(A/swine/Chiba/14/2012(H1N2))	Japón/2012	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	1469641
(A/swine/Korea/CY02-08/2012(H3N1))	Corea del Sur/2012	Cerdo	H3N1	HA, NA, NS Y M	1224820
(A/swine/Thailand/CU-P43/2012(H3N2))	Tailandia/2012	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS	1293743
(A/swine/Iowa/15/1930(H1N1))	USA/1930	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	380342
(A/swine/USA/1976/1931(H1N1))	USA/1931	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	671163
(A/swine/Ohio/23/1935(H1N1))	USA/1935	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	383539
(A/swine/Colorado/1/1977(H3N2))	USA/1977	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	385645
(A/swine/Ontario/00130/97(H3N2))	Canadá/1997	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS, M	133777
(A/Swine/North Carolina/35922/98 (H3N2))	USA/1998	Cerdo	H3N2	NS	101753
(A/Swine/Minnesota/593/99 (H3N2))	USA/1999	Cerdo	H3N2	HA, NA,	133775

				NS Y M	
(A/Swine/Iowa/569/99 (H3N2)	USA/1999	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	133774
(A/Swine/Iowa/533/99 (H3N2)	USA/1999	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	133773
(A/swine/Alabama/SG1224/2005(H3N2)	USA/2005	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	1432638
(A/swine/Alberta/00805/2005(H3N2)	Canadá/2005	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	1261847
A/Swine/Indiana/9K035/99(H1N2)	USA/99	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS	128982
(A/swine/Minnesota/5763/2003(H1N2)	USA/2003	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	1081401
A/swine/North Carolina/47834/2000	USA/2000	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1081397
(A/swine/Missouri/2124514/2006(H2N3)	USA/2006	Cerdo	H2N3	HA, NA, NS Y M	489926
(A/swine/Alberta/OTH-33-8/2009(H1N1)	Canadá/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	645113
(A/swine/4/Mexico/2009(H1N1)	México/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	702451
(A/swine/Minnesota/074A/2009(H1N1)	USA/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	941628
A/swine/Minnesota/02976/2010	USA/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	741937
(A/swine/Iowa/A01049478/2011(H1N1)	USA/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	260809
(A/swine/Missouri/A01203163/2012(H1N1)	USA/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1193960
A/swine/Ohio/A01432602/2013	USA/2013	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1316808
(A/swine/Illinois/A01490609/2014(H1N1)	USA/2014	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1454836
(A/swine/Illinois/A01729364/2016(H1N1)	USA/2016	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1789714
(A/swine/Minnesota/A01201429/2011(H1N2))	USA/2011	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	1171121
A/swine/Arkansas/SG1347/2010	USA/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1432589
(A/swine/Villa Clara/84/2010(H1N1)	Cuba/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1074270
(A/swine/Wisconsin/A01203142/2012(H1N1))	USA/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1784830

(A/swine/Iowa/A0143271/2013(H1N1))	USA/2013	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	260809
(A/swine/Kentucky/14TOSU23973/2014(H1N1))	USA/2014	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1476752
(A/swine/Iowa/A01489009/2015(H1N1))	USA/2015	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	260809
(A/swine/Indiana/A01728945/2016(H1N1))	USA/2016	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1784830
(A/swine/Indiana/A01729047/2016(H3N2))	USA/2016	Cerdo	H3N2	HA, NA, NS Y M	1789717
(A/swine/Argentina/SAGiles-31215/2009(H1N1))	Argentina/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA	665791
(A/swine/Peru/2010729232/2009(H1N1))	Perú/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA	1535308
A/swine/Brazil/12A/2010	Brasil/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	989335
A/swine/Colombia/1/2011	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1299904
A/swine/Argentina/CIP051-A201/2012	Argentina/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1317091
(A/swine/Brazil/18/2012(H1N1))	Brasil/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1543288
A/swine/Colombia/M1445/2015	Colombia/2015	Cerdo	H1N1	HA,NS Y M	1843479
(A/swine/Colombia/M1484/2015(H1N1))	Colombia/2015	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1000303
A/swine/Argentina/CIP112-2203/2016	Argentina/2016	Cerdo	H1N1	HA, NA	1898759
(A/swine/Argentina/CIP051-StaFeN2/2010(H1N2))	Argentina/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	909675
(A/swine/Brazil/31_11_3/2011(H1N2))	Brasil/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, NS Y M	1401671
(A/swine/Argentina/CIP051-C07-MP2-1/2013(H3N2))	Argentina/2013	Cerdo	H1N1	HA, NA Y M	1658820
(A/swine/Brazil/G2P1/2013(H1N2))	Brasil/2013	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	1564191
(A/swine/Chile/YA026/2014(H1N2))	Chile/2014	Cerdo	H1N2	HA, NA, NS Y M	1843480
A/swine/Argentina/CIP051-A2/2008	Argentina/2008	Cerdo	H3N2	HA, NA,Y M	1048444
(A/Aalborg/INS132/2009(H1N1))	Dinamarca/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	747846
(A/England/1072/2009(H1N1))	Inglaterra/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1230216
(A/Italy/05/2009(H1N1))	Italia/2009	Humano	H1N1	HA, NA,	651124

				NS Y M	
(A/Caen/2716/2009(H1N1))	Francia/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	655667
(A/Berlin/INS170/2009(H1N1))	Alemania/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	747879
(A/Berlin/INS430/2010(H1N1))	Alemania/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	856541
(A/La Reunion/803/2010(H1N1))	Francia/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1429809
A/England/00380709/2010	Inglaterra/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1645815
(A/Netherlands/2631b/2010(H1N1))	Países bajos/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	768421
(A/Bonn/INS533/2011(H1N1))	Alemania/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1228466
A/Brighton/INS3_669/2011(H1N1))	Reino Unido/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1469857
(A/Aarhus/INS3_653/2011(H1N1))	Dinamarca/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1469848
(A/Cheboksary/IIV-92/2011(H1N1))	Rusia/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1088745
(A/Chita/RII08/2012(H1N1))	Rusia/2012	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1283171
(A/Czech Republic/140/2012(H1N1))	República Checa/2012	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1472914
(A/Finland/214/2012(H1N1))	Finlandia/2012	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1541091
(A/Czech Republic/186/2013(H1N1))	República Checa/2013	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1416444
(A/Helsinki/131H28/2013(H1N1))	Finlandia/2013	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1389812
(A/Kazan/CRIE-03/2013(H1N1))	Rusia/2013	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1410470
(A/Helsinki/162M/2014(H1N1))	Finlandia/2014	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1537627
(A/Czech Republic/2/2014(H1N1))	República Checa/2014	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1472918
(A/Czech Republic/95/2015(H1N1))	República Checa/2015	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1783372
(A/Krasnodar/108/2015(H1N1))	Rusia/2015	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1898983
(A/Arkhangelsk/CRIE-109/2016(H1N1))	Rusia/2016	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1898981

(A/Beijing/7/2009(H1N1))	China/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	913819
(A/Nonthaburi/102/2009(H1N1))	Tailandia/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	644373
(A/Singapore/DMS65/2010(H1N1))	Singapur/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1672558
(A/Thailand/C602/2010(H1N1))	Tailandia/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	944383
(A/Singapore/TT5/2011(H1N1))	Singapur/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1041072
(A/Taiwan/4501/2011(H1N1))	Taiwan/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1050945
(A/Singapore/DMS1232/2012(H1N1))	Singapur/2012	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1672467
(A/Thailand/MR10580/2012(H1N1))	Tailandia/2012	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1602796
(A/Singapore/DMS1312/2013(H1N1))	Singapur/2013	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1672485
(A/Shanghai/Mix1/2014(H1N1))	China/2014	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1507007
(A/India/Kol-S4163/2015(H1N1))	India/2015	Humano	H1N1	HA, NA	1896955
(A/Japan/4914/2016(H1N1))	Japón/2016	Humano	H1N1	HA, NA	1921971
(A/Babol/13992/2016(H1N1))	Irán/2016	Humano	H1N1	HA, NA	1928287
(A/New York/3242/2009(H1N1))	USA/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	646714
(A/South Carolina/10/2010(H1N1))	USA/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1184589
(A/District of Columbia/WRAIR0313/2011(H1N1))	USA/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1078064
(A/Texas/23/2012(H1N1))	USA/2012	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1320510
(A/Boston/YGA_02024/2013(H1N1))	USA/2013	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1461817
(A/New York/WC-LVD-14-001/2014(H1N1))	USA/2014	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1523082
(A/Vermont/10/2015(H1N1))	USA/2015	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1824044
(A/Georgia/10/2016(H1N1))	USA/2016	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1909914
(A/Indiana/01/2017(H1N1))	USA/2017	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1940348
(A/Brazil/AVS05/2009(H1N1))	Brasil/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1194305

(A/Chile/19/2009(H1N1))	Chile/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	880809
(A/Argentina/HNRG14/2009(H1N1))	Argentina/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	703191
(A/Bogota/WRAIR0442T/2009(H1N1))	Bogotá/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	985904
(A/Trujillo/WRAIR9309F/2009(H1N1))	perú/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	985972
(A/Santa Cruz/46631/2009(H1N1))	Bolivia/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1396463
(A/Quito/WRAIR0617T/2009(H1N1))	Ecuador/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	985908
(A/Chile/115/2010(H1N1))	Chile/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1017250
(A/Argentina/HNRG102/2010(H1N1))	Argentina/2010	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	754756
(A/Brazil/AVS11/2011(H1N1))	brasil/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1194304
(A/Santiago/p1d1/2011(H1N1))	Chile/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1506703
(A/Santa Cruz/7941/2011(H1N1))	Bolivia/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1396468
(A/Peru/PER045/2011(H1N1))	Perú/2011	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1429440
(A/Lima/INS3_671/2012(H1N1))	Perú/2012	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1469882
(A/Santa Cruz/111/2012(H1N1))	Bolivia/2012	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1396455
(A/Santiago/p13d2/2013(H1N1))	Chile/2013	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	1507245
(A/Bogota/0466N/2009(H1N1))	Bogotá/2009	Humano	H1N1	HA, NA, NS Y M	664779
(A/cinnamon teal/Bolivia/4537/2001(H7N3))	Bolivia/2001	Aviar	H7N3	HA, NA, NS Y M	386312
(A/chicken/Chile/176822/02(H7N3))	Chile/2002	Aviar	H7N3	HA, NA Y M	244948
(A/chicken/Chile/184240-1/2002(H7N3))	Chile/2002	Aviar	H7N3	HA, NA, NS Y M	680714
(A/white-faced whistling- duck/Colombia/1/2011(H5N2))	Colombia/2011	Aviar	H5N2	HA, NA, NS Y M	1299909
(A/yellow-billed pintail/Chile/C1267/2015(H5N3))	Chile/2015	Aviar	H5N3	HA, NA, NS Y M	1844628
(A/chicken/Jalisco/CPA-01655-16-	Mexico/2016	Aviar	H7N3	HA, NA,	1854719

CENASA-95076/2016(H7N3))				NS Y M	
(A/mallard/Arkansas/15OS7607/2016(H7N3))	USA/2016	Aviar	H7N3	HA, NA, NS Y M	1924376
(A/Bogota/WR0090N/2009(H1N1))	Colombia/2009	Humano	H1N1	HA, NA	691530
(A/Bogota/WRAIR0088N/2009(H1N1))	Colombia/2009	Humano	H1N1	HA, NA, M	871598
(A/Medellin/WRAIR1297P/2008(H1N1))	Colombia/2008	Humano	H1N1	HA, NA, M, NS	1115118
(A/swine/Colombia/1-01/2009(H1N1))	Colombia/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1232620
(A/swine/Colombia/10/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1299904
(A/swine/Colombia/11/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1843469
(A/swine/Colombia/12/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1843470
(A/swine/Colombia/13/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1843471
(A/swine/Colombia/14/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1843472
(A/swine/Colombia/1403/2010(H1N1))	Colombia/2010	Cerdo	H1N1	HA	1113535
(A/swine/Colombia/2/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1299905
(A/swine/Colombia/3/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1299906
(A/swine/Colombia/4/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1299907
(A/swine/Colombia/5/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1299904
(A/swine/Colombia/6/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1299904
(A/swine/Colombia/8/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1843469
(A/swine/Colombia/9/2011(H1N1))	Colombia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1299904
(A/swine/Shandong/811/2009(H1N1))	China/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1151791
(A/swine/Jangsu/46/2010(H1N1))	China/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	934289
(A/swine/Guangdong/NS294/2011(H1N1))	China/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1511960
(A/swine/Guangdong/NS99/2012(H1N1))	China/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1511975

(A/swine/Guangdong/306/2013(H1N1))	China/2013	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1490472
(A/swine/Taiwan/TD-4119B2/2009(H1N1))	Taiwan/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	701235
A/swine/Taiwan/TD-2542/2010	Taiwan/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	907894
A/swine/Thailand/SB038/2010	Tailandia/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1315819
A/swine/La Reunion/0164/2010	Francia/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1037301
A/swine/France/71-130116/2013	Francia/2013	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1345163
(A/swine/Schallern/IDT19989/2014(H1N1))	Alemania/2014	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1825108
(A/swine/Italy/303612/2011(H1N1))	Italia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1654238
(A/swine/Italy/120336/2012(H1N1))	Italia/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1353289
(A/swine/Italy/153511-11/2013(H1N1))	Italia/2013	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1501086
(A/swine/England/373/2010(H1N1))	Inglaterra/2010	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1176084
(A/swine/Scotland/24678/2011(H1N1))	Escocia/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1654294
(A/swine/England/041313/2013(H1N1))	Inglaterra	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1654120
(A/swine/Arkansas/SG1321/2009(H1N1))	Estados Unidos/2009	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1432588
(A/swine/Iowa/A01049379/2011(H1N1))	Estados Unidos/2011	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1048369
(A/swine/Illinois/A01104011/2012(H1N1))	Estados Unidos/2012	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1194232
(A/swine/California/A00968789/2013(H1N1))	Estados Unidos/2013	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1305022
(A/swine/Nebraska/A01366774/2014(H1N1))	Estados Unidos/2014	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1454847
(A/swine/Minnesota/A01941304/2015(H1N1))	Estados Unidos/2015	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1761556
(A/swine/Missouri/A01775100/2016(H1N1))	Estados Unidos/2016	Cerdo	H1N1	HA, NA, M, NS	1857628